

**Charakterisierung von 3 Tiermodellen
zur Erzeugung einer interstitiellen Fibrose
der Rattenniere und therapeutische Beeinflussung der
uranylnitratbedingten Nierenfibrose**

Dissertation

*zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)*

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

VON

Sabine Sawall
geb. am 18. November 1975
in Heilbronn

Jutta Splinther
geb. am 19. Dezember 1975
in Heilbronn

Gutachter

1. Prof. Dr. Christian Fleck, Jena
2. Prof. Dr. Gustav Stein, Jena
3. Prof. Dr. Günter Kraatz, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.12.2003

Abkürzungsverzeichnis

A. renalis	Arteria renalis
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BUN	Blood Urea Nitrogen = Harnstoffstickstoff im Blut
C _{Krea(S)} bzw. (U)	Kreatininkonzentration im Serum bzw. im Urin
C _{Prot(U)}	Proteinkonzentration im Urin
Cl _{Krea}	Kreatininclearance
FG	Feuchtgewicht
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Halo	Halofuginone
Han:Wist	Hannover-Wistarratten
HE	Haematoxylin-Eosin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL-1	Interleukin 1
Isch 20 bzw. 45	20 bzw. 45 Minuten andauernde warme Ischämie
KG	Körpergewicht
Ko Ag 1295	Kontrolle Ag 1295
Ko Halo	Kontrolle Halofuginone
Ko Isch	Kontrolle Ischämie
Ko NX	Kontrolle 5/6 Nephrektomie
Ko UN	Kontrolle Uranyl Nitrat
Krea	Kreatinin
M _{Prot(U)}	im Urin ausgeschiedene Proteinmenge
n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt
NBD-Cl	4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan
NG	Nierengewicht
NX	Nephrektomie
OH-Prolin	Hydroxyprolin
OP	Operation
OPA	o-Phthaldialdehyd
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Prot.	Protein
s.c.	subcutan
Schein-OP	Scheinoperation
SIR	Siriusrot
TG	Trockengewicht
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UN 0,3 bzw. 0,5	0,3 bzw. 0,5mg Uranyl Nitrat/100g KG
uNX	unilaterale Nephrektomie
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
V _(U)	Harnvolumen
V. renalis	Vena renalis

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ	4
2.2 PARAMETER ZUR DIAGNOSTIK EINER NIERENSCHÄDIGUNG	5
2.2.1 Körper- und Nierengewicht	5
2.2.2 Harnvolumen	6
2.2.3 Kreatininclearance und Serumkreatininkonzentration	6
2.2.4 Renale Proteinausscheidung	7
2.2.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	8
2.2.6 Histologie	8
2.3 TIERMODELLE ZUR ERZEUGUNG EINER CHRONISCHEN NIERENINSUFFIZIENZ	9
2.3.1 Temporäre und chronische renale Ischämie	9
2.3.2 Unilaterale Ligatur der Vena renalis	10
2.3.3 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)	10
2.3.4 5/6 Nephrektomie (5/6 NX)	11
2.3.5 Applikation von Nephrotoxinen	12
2.4 NIERENFIBROSE	13
2.4.1 Glomerulosklerose	14
2.4.2 Tubulointerstitielle Fibrose	14
2.4.3 Vaskuläre Sklerose	15
2.5 THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG DER NIERENFIBROSE	16
2.5.1 Ag 1295	16
2.5.2 Halofuginone	17
3 ZIELE DER ARBEIT	18

4 MATERIAL UND METHODEN	20
4.1 VERSUCHSTIERE	20
4.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	20
4.2.1 Narkose	20
4.2.2 Diureseversuch und Harngewinnung	20
4.2.3 Serumgewinnung	21
4.2.4 Entnahme der Nieren	21
4.3 VERSUCHSGRUPPEN	21
4.3.1 Temporäre warme Ischämie (Isch)	21
4.3.2 5/6 Nephrektomie (5/6 NX)	22
4.3.3 Uranylinitrat (UN)	23
4.3.4 Ag 1295	23
4.3.5 Halofuginone (Halo)	24
4.3.6 Zusammenstellung aller Versuchsgruppen	24
4.4 BESTIMMUNGSMETHODEN	26
4.4.1 Bestimmung des Körpergewichts	26
4.4.2 Bestimmung des Harnvolumens	26
4.4.3 Bestimmung der Kreatininkonzentration	26
4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin	26
4.4.5 Bestimmung von Hydroxyprolin im Nierengewebe	27
4.4.6 Morphologie	28
4.5 BERECHNUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
 5 ERGEBNISSE	 32
5.1 EINFLUSS EINER TEMPORÄREN WARMEN ISCHÄMIE AUF DIE NIERENFUNKTION	32
5.1.1 Körpergewicht	32
5.1.2 Harnvolumen	32
5.1.3 Kreatininclearance	33
5.1.4 Renale Proteinausscheidung	34
5.1.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	35
5.1.6 Morphologie	36
5.2 EINFLUSS EINER 5/6 NX AUF DIE NIERENFUNKTION	38
5.2.1 Körpergewicht	38

5.2.2	Harnvolumen	39
5.2.3	Kreatininclearance	39
5.2.4	Renale Proteinausscheidung	40
5.2.5	Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	41
5.2.6	Morphologie	42
5.3	EINFLUSS EINER EINMALIGEN GABE VON URANYLNITRAT AUF DIE NIERENFUNKTION	43
5.3.1	Körpergewicht	43
5.3.2	Harnvolumen	43
5.3.3	Kreatininclearance	44
5.3.4	Renale Proteinausscheidung	45
5.3.5	Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	46
5.3.6	Morphologie	47
5.4	EINFLUSS VON HALOFUGINONE BZW. AG 1295 AUF DIE NIERENFUNKTION VON KONTROLLRATTEN	51
5.4.1	Körpergewicht	51
5.4.2	Harnvolumen	52
5.4.3	Kreatininclearance	52
5.4.4	Renale Proteinausscheidung	53
5.4.5	Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	53
5.4.6	Morphologie	54
5.5	EINFLUSS VON AG 1295 AUF DIE NIERENFUNKTION NACH URANYLNITRAT-GABE	56
5.5.1	Körpergewicht	56
5.5.2	Harnvolumen	57
5.5.3	Kreatininclearance	57
5.5.4	Renale Proteinausscheidung	58
5.5.5	Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	59
5.5.6	Morphologie	60
5.6	EINFLUSS VON HALOFUGINONE AUF DIE NIERENFUNKTION NACH URANYLNITRAT-GABE	62
5.6.1	Körpergewicht	62
5.6.2	Harnvolumen	63
5.6.3	Kreatininclearance	63

5.6.4	Renale Proteinausscheidung	64
5.6.5	Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe	65
5.6.6	Morphologie	66
6	DISKUSSION	70
6.1	TIERMODELLE ZUR ERZEUGUNG EINER NIERENFIBROSE	70
6.1.1	Auswirkungen einer temporären warmen Ischämie auf die Nierenfunktion	70
6.1.2	Auswirkungen der 5/6 Nephrektomie auf die Nierenfunktion	72
6.1.3	Auswirkungen einer einmaligen Gabe von Uranylнитrat auf die Nierenfunktion	74
6.1.4	Vergleich der verschiedenen Tiermodelle zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose	75
6.2	MEDIKAMENTÖSE BEEINFLUSSUNG DER ENTSTEHUNG EINER NIERENFIBROSE	78
6.2.1	Auswirkungen von Ag 1295 auf die Nierenfunktion von Kontrollratten	78
6.2.2	Auswirkungen von Halofuginone auf die Nierenfunktion von Kontrollratten	79
6.2.3	Einfluß von Ag 1295 auf eine durch Uranylнитrat erzeugte Nierenfibrose	80
6.2.4	Einfluß von Halofuginone auf eine durch Uranylнитrat erzeugte Nierenfibrose	83
6.2.4.1	Applikation von Halofuginone gleichzeitig mit Uranylнитrat (UN 0,5 + Halo I)	83
6.2.4.2	Applikation von Halofuginone nach Ende der akuten Phase (UN 0,5 + Halo II)	85
6.2.5	Vergleich der Wirksamkeit von Ag 1295 und Halofuginone als Schutz vor einer Nierenfibrose	87
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	91
8	LITERATURVERZEICHNIS	93

9 ANHANG	107
9.1 DATEN UND TABELLEN	107
9.2 DANKSAGUNG	117
9.3 LEBENSLÄUFE	118
9.3.1 Angaben zur Person (Sabine Sawall)	118
9.3.2 Angaben zur Person (Jutta Splinther)	119
9.4 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG UND SELBSTÄNDIGKEITS- ERKLÄRUNG	120

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Tiermodelle zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose bei erwachsenen weiblichen Wistarratten verglichen:

1. die temporäre warme Ischämie von 20 bzw. 45 Minuten Dauer (**Isch 20** bzw. **Isch 45**) mit nachfolgender Entnahme der kontralateralen Niere am darauffolgenden Tag,
2. die 5/6 Nephrektomie (**5/6 NX**) und
3. die einmalige Applikation von 0,3 bzw. 0,5mg Uranyl Nitrat/100g KG i.p. (**UN 0,3** bzw. **UN 0,5**).

Es standen vor allem subchronische Auswirkungen der unterschiedlichen Methoden auf die Nieren im Vordergrund. Ein Vergleich wurde anhand folgender Parameter angestellt: *Körpergewicht, Harnvolumen, Kreatininclearance* (Bestimmung anhand der Jaffé-Methode), *renale Proteinausscheidung* (Proteinbestimmung nach Bradford), *OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe* (Messung mittels HPLC), *Morphologie*.

Eine **temporäre warme Ischämie** ist durch eine Letalität von 41% (20min) bzw. 66% (45min) gekennzeichnet. Bei den überlebenden Tieren waren die funktionellen Parameter lediglich in den ersten 10 Wochen nach dem Eingriff verändert. Nach 20 Wochen hatten Kompensationsvorgänge stattgefunden, die zu einer fast vollständigen restitutio ad integrum kam. Da eine interstitielle Nierenfibrose histologisch nicht gefunden wurde und eine hohe Sterblichkeit auftrat, war dieses Modell für unsere Fragestellung nicht brauchbar.

Eine Einschränkung der Nierenfunktion über 20 Wochen wurde nach **5/6 NX** deutlich, obwohl auch hier effektive Kompensationsvorgänge einsetzten. Histologisch konnte jedoch wiederum keine interstitielle Nierenfibrose gefunden werden. Allerdings wiesen die Proteinurie und die eingeschränkte Kreatininclearance auf einen persistierenden Nierenschaden hin.

Nach Regeneration der akuten Nierenschädigung zeigte sich bis 20 Wochen nach **Applikation von Uranyl Nitrat (UN)** eine Einschränkung der Kreatininclearance und verstärkte Proteinurie vor allem bei Tieren, welche die höhere Dosis (UN 0,5) erhalten hatten. Makroskopisch waren die Nieren der Gruppe UN 0,5 verkleinert und die Oberfläche vernarbt. Histologisch konnte ab der 4. Woche eine interstitielle Nierenfibrose vor allem nach Applikation der höheren Dosis gefunden werden.

Der Vergleich der drei Tiermodelle belegt die gute Eignung einer einmaligen Applikation von UN 0,5 zur Erzeugung einer Nierenfibrose. An Tieren mit einer UN-bedingten Nierenschädigung wurden weiterführende Untersuchungen zur therapeutischen Beeinflussung

einer interstitiellen Nierenfibrose durch **Ag 1295** (PDGF-Antagonist) und **Halofuginone** (Halo; Kollagen-Typ-I-Synthesehemmer) durchgeführt.

Zunächst wurde die Wirkung von Ag 1295 auf die Nierenfunktion untersucht (**Ko Ag 1295**). Es erfolgte über 2 Wochen die tägliche Injektion von 1,2mg Ag 1295/100g KG i.p. Nach 2 Versuchswochen waren die oben genannten funktionellen Parameter pathologisch verändert. Nach weiteren 2 Wochen waren diese Veränderungen zwar leicht regredient, die histologische Untersuchung der Nieren zeigte allerdings noch starke Schädigungszeichen. Weitere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum wurden nicht durchgeführt, da auf Grund des Fortbestehens der Schädigung Ag 1295 als Medikament zur Therapie einer Nierenfibrose nicht in Frage kam.

In parallel dazu durchgeführten Versuchen konnte eine protektive Wirkung von Ag 1295 auf die UN-geschädigte Niere (**UN 0,5 + Ag 1295**) nicht gefunden werden. Über 2 Wochen wurden täglich 1,2mg Ag 1295/100g KG i.p. injiziert, am 2. Tag des Versuches erfolgte eine einmalige Injektion von UN. Anhand der histologischen Untersuchung der Nieren von Tieren, die UN in Kombination mit Ag 1295 erhalten hatten, konnten die gravierendsten Veränderungen aller Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Eine temporäre Einschränkung der Nierenfunktion wurde auch bei den Tieren, die ausschließlich Halo (tägliche Injektion von 4µg Halo/100g KG über 20 Wochen) erhalten hatten (**Ko Halo**), deutlich.

Bei Gabe von UN zu Beginn der Halo-Therapie (4µg Halo/100g KG i.p. über 20 Wochen, am 2. Tag einmalige Gabe von UN 0,5 i.p., **UN 0,5 + Halo I**) kam es zu einer Abschwächung der UN-bedingten Schädigungszeichen der Nieren. Die Tiere erholten sich rasch, so daß nach 20 Versuchswochen keine Unterschiede zu gesunden Ratten mehr nachweisbar waren. Histologisch wiesen die Nieren nach 10 Versuchswochen nur leichte Schädigungszeichen auf. Faßt man die Befunde zusammen, so hat Halo bei *gleichzeitiger* Verabreichung mit UN nur eine geringe protektive Wirkung.

Einen wesentlich besseren Effekt von Halo zeigte die Untersuchung der Gruppe, bei der zwischen UN-Gabe und Halo-Therapie ein Intervall von 10 Tagen lag (**UN 0,5 + Halo II**; einmalige Injektion von UN 0,5 i.p., nach 10 Tagen tägliche Injektion von 4µg Halo/100g KG i.p.). Zwar deuteten auch hier in der Anfangsphase pathologische Veränderungen weniger Parameter leichte nephrotoxische Effekte des UN an, jedoch geringer als in allen anderen Gruppen. Als wichtiges Kriterium entsprach die Morphologie der Nieren der gesunder Tiere. Der Kollagensynthesehemmer Halo ist somit offensichtlich zur Vermeidung der Entstehung einer chronischen Nierenfibrose gut geeignet.

2 Einleitung

Die Niere hat die Aufgabe, Stoffwechselendprodukte und Fremdstoffe mit dem Endharn zu eliminieren und für den Organismus wertvolle Substanzen wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate und Aminosäuren im Körper zurückzuhalten (HIERHOLZER und FROMM 1995). Weitere wichtige Funktionen der Niere zur Konstanthaltung des inneren Milieus sind die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie des Säure-Basen-Haushaltes, die Synthese und Freisetzung verschiedener Hormone wie z.B. Erythropoetin bzw. 1,25-Dihydroxycholecalciferol und die Regulation des Blutdrucks durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (GEIGER 1998).

Die Zusammensetzung des Ultrafiltrats wird durch die Barrierefunktion der Podozytenmembran beeinflusst. Es ist aus früheren Studien bekannt, daß drei verschiedene Faktoren die Filtration von Makromolekülen bestimmen. Zum einen sind hämodynamische Parameter wie der renale Blutfluß und der Blutdruck in den glomerulären Kapillaren bedeutsam. Des weiteren determinieren die Molekülgröße und elektrostatische Interaktionen zwischen den im Blut zirkulierenden Makromolekülen und der Filtrationsmembran das Ausmaß der glomerulären Filtration einer Substanz. So werden beim Menschen und auch bei der Ratte Makromoleküle ab einem Durchmesser von mehr als 2-4nm von der Podozytenmembran zurückgehalten und erscheinen unter physiologischen Bedingungen nicht im Primärharn (BOHRER et al. 1978). Niedermolekulare Proteine und Aminosäuren werden durch die glomeruläre Kapillarwand frei filtriert und erscheinen im Primärharn. Im proximalen Tubulus werden sie rückresorbiert, so daß im Endharn unter physiologischen Bedingungen nur noch eine geringe Menge an Proteinen nachzuweisen ist (HÖRL 1998).

Ein wichtiger Faktor zur Bestimmung der Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Sie beträgt beim Menschen durchschnittlich 120ml/min und bei der Ratte 0,7ml/min pro 100g KG (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991). Das Ausmaß der GFR hängt ab von der Filtrationsfläche und deren Durchlässigkeit, von der Differenz zwischen hydrostatischem und kolloidosmotischem Druck sowie vom Druck, der in der Bowman-Kapsel herrscht (HIERHOLZER und FROMM 1995). Veränderungen der GFR können auf ein beginnendes Nierenversagen hinweisen (FLECK 1999).

Störungen der Nierenfunktion wirken sich auf den gesamten Organismus aus und können lebensbedrohlich werden. So ist beispielsweise die interstitielle Nierenfibrose die häufigste Ursache einer terminalen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz beim Menschen (SOMMER und FÜNFSTÜCK 1997).

2.1 Chronische Niereninsuffizienz

Bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz ist die Niere nicht in der Lage, eine ausreichende Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen aufrecht zu erhalten. Es entwickelt sich nach dem Stadium der sogenannten „kompensierten Retention“ mit einer Erhöhung der Serumkonzentration harnpflichtiger Substanzen, aber noch fehlenden Intoxikationszeichen, über das Stadium der „dekompensierten Retention“ eine Urämie. Die Urämie ist Ausdruck einer terminalen Niereninsuffizienz mit kardiovaskulären und gastrointestinalen Symptomen, renal bedingter Anämie, Osteo- und Neuropathien (RITZ und ANDRASSY 1998).

Einen ersten Hinweis auf eine beginnende Nierenschädigung stellt die Erhöhung der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Blut dar. Ein progredienter Verlust von funktionstüchtigem Nierenparenchym führt zu einem Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz. Durch Retention von toxischen Stoffwechselendprodukten kommt es zur Überladung des Organismus mit sogenannten Urämetoxinen. Neben Abbauprodukten des Eiweiß- und Purinstoffwechsels zählen dazu auch Guanidine, Phenolderivate und Kresole, die weitere Organschäden mitbedingen (WEHNER et al. 1989). Die Ursachen einer Niereninsuffizienz sind vielschichtig und oft nicht sofort erkennbar. Eine wichtige Voraussetzung für die normale Funktion der Niere ist eine ausreichende Produktion von Glomerulumfiltrat. Eine irreversible Reduktion der GFR ist charakteristisch für die chronische Niereninsuffizienz und beruht auf einer zunehmenden Destruktion funktionstüchtiger Nephrone. Jedoch treten erst Symptome auf, wenn die GFR auf weniger als 50% absinkt. Die routinemäßig erfaßten Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion wie z. B. Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Blut sowie der Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt bleiben anfangs noch im Normbereich. Eine verminderte Kreatininclearance kann dagegen einen ersten Anhaltspunkt für eine Schädigung der Nieren geben (WANNER und GALLE 1998). Beispielsweise ist die Kreatininausscheidung im Harn bei Ratten 3 Wochen nach 5/6 NX mit $2,32 \pm 0,04 \mu\text{mol}/100\text{g} \times 2\text{h}$ gegenüber Ratten mit zwei intakten Nieren ($2,64 \pm 0,04 \mu\text{mol}/100\text{g} \times 2\text{h}$) signifikant erniedrigt. Auch die Proteinausscheidung gibt Hinweise auf die Funktion der Nieren. Diese ist bei Ratten 3 Wochen nach 5/6 NX etwa 6 mal höher als bei Kontrolltieren (BRÄUNLICH et al. 1997). Eine unilaterale Nephrektomie (uNX) führt beim Menschen zu einer Abnahme der GFR und einer gesteigerten Proteinausscheidung. Im Verlauf von 10 Jahren kommt es jedoch zu einem Wiederanstieg der GFR. Die uNX führt beim Menschen demnach nicht zu einer progressiven renalen Dysfunktion, allerdings findet man einen gesteigerten systolischen Blutdruck (KASISKE et al. 1995).

Charakteristisch für die chronische Niereninsuffizienz in einem fortgeschrittenen Stadium ist die starke Schrumpfung der Niere und die weitgehende Zerstörung des Parenchyms. Die Oberfläche erscheint höckrig und narbig durchsetzt, wobei das Gewicht der Nieren beim Menschen unter 100g pro Niere absinkt (GRÖNE und THOMAS 1996) im Vergleich zum normalen Nierengewicht von 120 bis 200g (LIPPERT 1993). Eine Ursache, die zur Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz führt, ist die chronische renale Ischämie auf Grund von beispielsweise arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße oder den schädigenden Einflüssen eines langjährigen schlecht eingestellten Diabetes mellitus. Auf Grund der schleichenden Entwicklung kommt es zu einer begrenzten Schädigung, durch welche die Niere nicht sofort funktionslos wird. Vielmehr wird eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Adaptationsmechanismen in Gang gesetzt, welche die Nierenfunktion noch über längere Zeit aufrecht erhalten können (SHANLEY 1996).

2.2 Parameter zur Diagnostik einer Nierenschädigung

Schon einfache und nicht invasive Untersuchungen können Hinweise auf Veränderungen der Nierenfunktion geben. Neben Anamnese und klinischer Untersuchung zählen dazu vor allem Laboruntersuchungen von Urin und Blut sowie bildgebende Diagnostik mittels verschiedener Sonographie- und Röntgenverfahren. Die Entnahme einer Nierenbiopsie kann differentialdiagnostisch vor allem bei glomerulären Erkrankungen von Bedeutung sein (HÖRL 1998; HEROLD 2001).

2.2.1 Körper- und Nierengewicht

JACKSON et al. (1987) beschrieben in ihrer Studie Ratten mit einem Ausgangsgewicht zwischen 210 und 250g, die eine Woche nach 7/8 NX einen Gewichtsverlust zwischen 12 und 14% ($28,9 \pm 4,7\text{g}$) aufwiesen. Im weiteren Beobachtungszeitraum von 6 Wochen kam es zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme. Eine durch 5/6 NX erzeugte Urämie führte bei Ratten zu einer langsameren Zunahme an Gewicht im Vergleich zu Kontrolltieren (FLECK 1999). Indem man das Nierengewicht auf das Körpergewicht bezieht, kann man das Ausmaß einer renalen Hypertrophie bestimmen. So konnten AZUMA et al. (1997) 52 Wochen nach 45-minütiger warmer Ischämie der Niere und anschließender kontralateraler NX durch die Berechnung des relativen Nierengewichtes eine renale Hypertrophie um 14% im Vergleich zu einer 45-minütigen warmen Ischämie einer Niere ohne kontralaterale NX feststellen. Nach uNX kommt es durch den Parenchymverlust neben einer Zunahme der Nierenmasse auch zu Veränderungen der tubulären Sekretion sowie der glomerulären Filtration der kontralateralen

Niere. Die initiale Leistungssteigerung des Nierengewebes nach Entnahme von Parenchym ist rückläufig und wird kompensiert durch eine Hypertrophie des verbleibenden Nierengewebes mit normaler oder auch erhöhter Effizienz des einzelnen Nephrons (FLECK und BRÄUNLICH 1983). Aus früheren Studien ist bekannt, daß nach Entnahme von Nierenparenchym das in situ verbleibende Nierengewebe an Gewicht zunimmt. Die relative Zunahme ist um so größer, je mehr Gewebe entfernt wurde. Die Zunahme der Nierenmasse ist sowohl durch hyperplastische als auch durch hypertrophische Anpassungsvorgänge bedingt (FLECK und BRÄUNLICH 1984).

2.2.2 Harnvolumen

Die Glomeruli produzieren beim Menschen etwa 170 l Primärharn pro Tag. Zur Ausscheidung gelangen allerdings nur etwa 1-2 l Endharn, der durch Reabsorptions- und Sekretionsvorgänge modifiziert wird. Dabei wirken zahlreiche Faktoren auf Volumen, Konzentration und Zusammensetzung des Endharns ein (GEIGER 1998). Veränderungen im Harnvolumen können frühzeitig auf eine Nierenschädigung hinweisen. Sowohl eine Oligurie bzw. Anurie wie auch eine Polyurie sind dabei diagnostisch von Bedeutung (HEROLD 2001).

Das Harnvolumen von Ratten nimmt zwischen dem 5. und 10. Lebenstag ab und liegt unterhalb von 0,5ml/100g KG x h. Bis zum 55. Lebenstag kommt es zu einer Zunahme des Harnvolumens, das im weiteren Verlauf konstant zwischen 0,9 und 1,2ml/100g KG x h liegt (APPENROTH und BRÄUNLICH 1986). FLECK und HELLER (1993) beschrieben eine Polyurie bei Ratten 5 Tage nach einer beidseitigen Ischämie der Nieren von 45 Minuten. Die Steigerung des Harnvolumens auf über das Doppelte im Vergleich zum Ausgangswert war bereits nach 8 Tagen nicht mehr nachzuweisen.

2.2.3 Kreatininclearance und Serumkreatininkonzentration

Die Serumkonzentration von Kreatinin dient als Maß der glomerulären Filtrationsleistung. Die Konzentration von Kreatinin im Serum ist unter physiologischen Bedingungen konstant, hängt aber dennoch von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise von der Muskelmasse oder von vorbestehenden Erkrankungen ab. Der Normalbereich der Serumkreatininkonzentration beim Menschen liegt bei 44 – 106µmol/l (HÖRL 1998).

Neben der Serumkonzentration von Kreatinin kann die GFR durch Berechnung der Clearance verschiedener Markersubstanzen bestimmt werden. So stellt u.a. die endogene Kreatininclearance ein geeignetes Maß zur Abschätzung der GFR dar. Kreatinin wird hauptsächlich glomerulär filtriert, praktisch nicht sezerniert und auch nicht rückresorbiert. Eine

eingeschränkte Kreatininclearance weist auf eine Nierenerkrankung hin, wobei zu berücksichtigen ist, daß die GFR mit zunehmendem Alter physiologischerweise abnimmt (HIERHOLZER und FROMM 1995). Nach HSU et al. (1999) haben Ratten mit zwei intakten Nieren und normaler Nierenfunktion eine durchschnittliche Kreatininclearance von $0,43 \pm 0,03 \text{ ml/100g} \times \text{min}$. Einen Tag nach 45-minütiger bilateraler Ischämie der Rattennieren fanden FLECK und HELLER (1993) eine signifikant erniedrigte Kreatininclearance, die sich nach 5 Tagen wieder normalisiert hatte und somit auf eine Wiederherstellung der Nierenfunktion hinwies. Nach uNX ist die GFR ein geeigneter Parameter, um das Ausmaß der Kompensation festzustellen. Ein Anstieg der GFR pro Gramm Nierengewicht ist die erste Reaktion der verbliebenen Niere auf die Parenchymreduktion und somit erstes Zeichen einer beginnenden Kompensation (FLECK und BRÄUNLICH 1984).

Es besteht eine negative Korrelation zwischen der GFR und der Serumkreatininkonzentration, vorausgesetzt die Kreatininbildung ist konstant: Eine Abnahme der GFR bewirkt dann eine Zunahme der Serumkreatininkonzentration. Allerdings ist die Serumkonzentration von Kreatinin nur ein näherungsweiser Indikator zur Abschätzung der GFR (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991). Bei Ratten lassen sich in Bezug auf die Plasmakreatininkonzentration keine wesentlichen Veränderungen mit zunehmendem Alter zwischen 3 und 30 Monaten feststellen (IGLESIAS-DE LA CRUZ et al. 2000). TAKADA et al. (1999) beschrieben bei 10 Wochen alten Ratten mit zwei intakten Nieren eine Serumkreatininkonzentration von $5,6 \pm 0,8 \text{ mg/l}$. 10 Tage nach uNX fanden sie einen Wert von $7,2 \pm 0,6 \text{ mg/l}$. Nach beidseitiger 45-minütiger Ischämie von Rattennieren stellten FLECK und HELLER (1993) einen Tag nach dem Eingriff eine Zunahme der Serumkreatininkonzentration um mehr als das Doppelte fest, die im weiteren Verlauf rückläufig war und bis zum 8. Tag wieder den Normwert erreichte.

2.2.4 Renale Proteinausscheidung

Zur Früherkennung und Verlaufsbeobachtung von Nierenerkrankungen dient als einfacher und nichtinvasiver Marker die Bestimmung der renalen Proteinausscheidung. Neben der Gesamtmenge der Proteine im Harn kann man zusätzlich die Zusammensetzung der Proteine bestimmen, die in klein-, mittel- und hochmolekulare Eiweiße eingeteilt werden. Dies dient der Unterscheidung in prärenale, renale (glomeruläre und tubuläre Proteinurien sowie Mischformen) oder postrenale Proteinurie (HOFMANN et al. 2001). In der Niere werden nur niedermolekulare Moleküle und Aminosäuren, sowie geringe Mengen Albumin filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert. Beim Menschen ist eine Ausscheidung von bis zu

150mg Eiweiß im Urin pro Tag als Normalwert anzusehen. Wird diese Grenze jedoch dauerhaft überschritten, liegt der Verdacht auf eine parenchymatöse Nierenerkrankung vor, die ganz unterschiedlicher Genese sein kann (HÖRL 1998). Die Proteinkonzentration im Urin der Ratten ist in der postnatalen Periode erhöht und fällt bis zum 33. Lebenstag ab (APPENROTH und BRÄUNLICH 1986). Mit zunehmendem Alter steigt die renale Proteinausscheidung bei Ratten zwischen 3 und 30 Monaten (IGLESIAS-DE LA CRUZ et al. 2000). BRÄUNLICH et al. (1997) fanden bei einer Untersuchung der Proteinurie bei Kontrolltieren mit zwei intakten Nieren eine Ausscheidung von Eiweiß in Höhe von $0,19 \pm 0,02\text{mg}/100\text{g KG} \times 2\text{h}$. Drei Wochen nach 5/6 NX ergab sich eine Proteinurie von $1,16 \pm 0,22\text{mg}/100\text{g KG} \times 2\text{h}$.

2.2.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

In fibrotischen Geweben ist eine erhöhte Kollagenanreicherung zu finden (GONZÁLEZ-AVILA et al. 1988). Die Konzentration an Kollagenen kann durch die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration (OH-Prolinkonzentration) im Nierengewebe abgeschätzt werden, da Kollagen zu etwa 1/3 aus der Aminosäure OH-Prolin besteht. SOMMER et al. (1999) fanden bei Ratten nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO) bis zum 25. Tag nach dem Eingriff eine ansteigende OH-Prolin-Konzentration im Nierengewebe der betroffenen Seite. Die kontralaterale Niere sowie die Nieren von Kontrolltieren wiesen konstant niedrige Werte auf. Dieses Resultat wurde durch die histologische Untersuchung bestätigt, bei der die Entwicklung einer schweren Nierenfibrose bis zum 25. Tag beschrieben wurde.

2.2.6 Histologie

Die Nieren lassen sich unterteilen in Nierenrinde und Nierenmark. Hier ist das Tubulussystem mit Nephronen und Sammelrohren eingebettet, das umgeben vom Interstitium, bei zahlreichen Transportvorgängen eine wichtige Rolle spielt. Bei Ausfall einer Niere kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie der anderen Niere, zunächst durch Vergrößerung der Epithelien, dann auch durch Mitosen im Tubulusbereich als hyperplastischer Vorgang. Allerdings werden keine neuen Nephrone gebildet (LEONHARDT 1990 b).

Akute entzündliche Reaktionen im Interstitium sind oft bedingt durch allergische Medikamentenreaktionen, Abstoßungsreaktionen nach Transplantation oder durch Infektionen. Chronische Veränderungen der Nieren führen zu tubulären Schädigungen. Entzündliche und fibrotische Veränderungen im Niereninterstitium sind bei vielen

progressiven Nierenerkrankungen zu finden, wobei die primäre Ursache verschiedenartig sein kann (BECKER und HEWITSON 1997).

2.3 Tiermodelle zur Erzeugung einer chronischen Niereninsuffizienz

Ein chronischer Nierenschaden kann Folge unterschiedlicher Einflüsse sein. Deshalb sind verschiedene Ansätze zur tierexperimentellen Erzeugung einer Niereninsuffizienz verwendet worden. Eine verminderte renale Blutzufuhr bewirkt verschiedenartige adaptive Reaktionen als Folge der Schädigung von Zellen durch ein reduziertes Sauerstoffangebot sowie nachfolgender reparativer Vorgänge. Beim Menschen können chronische ischämische Zustände der Niere, wie sie beispielsweise bei Arteriosklerose zu finden sind, zum Endstadium einer Niereninsuffizienz führen (SHANLEY 1996). Ein Parenchymverlust führt über die Reduktion von funktionstüchtigen Nephronen zu einer Proteinurie und einer progressiven Niereninsuffizienz sowie zur Hypertonie (ROSSMANN et al. 1990). Eine Schädigung der Nieren kann auch Folge von Einflüssen nephrotoxischer Substanzen sein. Bekannt ist die zur terminalen Niereninsuffizienz führende Analgetikanephropathie (HEIDBRETER und SCHRÄMM 1998). In früheren Studien (CUHACI et al. 1999) ist die Entwicklung einer Transplantatfibrose beschrieben, wobei der Entstehungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Eine wichtige Rolle scheint jedoch die chronische Toxizität von Medikamenten wie beispielsweise Cyclosporin A zu spielen (TAKADA et al. 1999). Auch Schwermetalle wirken toxisch auf die Nieren. FLECK (1999) beschrieb eine Abnahme der GFR nach Applikation von Cisplatin, Chromat und Thallium.

2.3.1 Temporäre und chronische renale Ischämie

Hypertonie, Diabetes mellitus, Arteriosklerose, Niereninfarkt und Hyperlipidämien sind nicht selten Ursache für eine chronische renale Ischämie. Als Folge kommt es häufig zu einer chronischen Niereninsuffizienz. Im Tiermodell gibt es verschiedene Methoden, um eine renale Schädigung durch eine Ischämie zu induzieren:

- Ein Verfahren zur Erzeugung ischämiebedingter Nierenschäden ist die einseitige warme Ischämie von 45 Minuten mit anschließender Reperfusion und kontralateraler Nephrektomie (uNX). Mit dieser Methode konnten AZUMA et al. (1997) eine chronische Schädigung der Niere erzeugen. Ohne nachfolgende uNX hatte die temporäre warme Ischämie keine wesentlichen Auswirkungen auf die Nierenfunktion. Das Belassen der kontralateralen Niere in situ kompensiert somit die Folgen der temporären warmen Ischämie nahezu vollständig. Charakteristisch für die Folgen der Ischämie mit

anschließender uNX ist eine Infiltration mit T-Zellen und Makrophagen in der reperfundierten Niere.

- Als weiteres tierexperimentelles Verfahren zur Erzeugung einer chronischen renalen Ischämie dient eine Stenose der A. renalis. MORAN et al. (1992) platzierten verstellbare Stahlclips in die linke A. renalis von Schweinen und führten so eine einseitige Reduktion des renalen Blutflusses herbei. Unmittelbar im Anschluß bestimmten sie den Blutfluß in der linken Nierenvene und wiederholten die Messungen drei Wochen nach der Operation. Des weiteren ermittelten sie die Anreicherung von radioaktiv markiertem Cobalt, das Aufschluß über den Blutfluß zur Niere gibt und die Berechnung des totalen und des regionalen intrarenalen Blutflusses erlaubt. Als frühe histologische Veränderungen fanden sie ein verkleinertes glomeruläres Volumen, eine tubuläre Atrophie mit interstitieller Nierenfibrose und verdickten Arteriolen. Die morphologischen Veränderungen entsprachen dem Grad der Ischämie. Die genannten Veränderungen waren nach LIBERTINO et al. (1980) reversibel, da keine glomeruläre Hyalinisierung auftrat, die als Indikator für eine irreversible Schädigung gewertet wird.

2.3.2 Unilaterale Ligatur der Vena renalis

GONZÁLEZ-AVILA et al. (1988) wandten zur Erzeugung einer Niereninsuffizienz die Methode der unilateralen Ligatur der V. renalis an. Dabei wird eine V. renalis operativ vollständig ligiert. 25 Tage nach dem Eingriff kommt es zu einer tubulären Atrophie mit interstitieller Fibrose und Verdickung der tubulären Basalmembran, wobei ein erniedrigter Abbau von Kollagen eine wichtige Rolle spielt. Trotz Zunahme des Kollagengehaltes reduzierte sich das Nierengewicht auf Grund der Atrophie um 60%.

2.3.3 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Auch eine unilaterale Ureterobstruktion kann zu einer interstitiellen Nierenfibrose führen. Es entwickelt sich eine obstruktive Nephropathie. Eine interstitielle Nierenfibrose kann man schon ab dem 10. Tag nach UUO feststellen. Ihre Schwere nimmt bis zum 25. Tag nach der Ligatur zu. Nach dieser Zeit ist die Fibrose vollständig ausgeprägt (SOMMER und FÜNFSTÜCK 1997; SOMMER et al. 1999). Die UUO ist ein etabliertes Modell zur Erzeugung einer tubulointerstitiellen Fibrose der von der Obstruktion betroffenen Niere. Es resultieren hämodynamische Veränderungen sowie eine Infiltration der Niere mit Makrophagen. Ferner kommt es zu einer Fibroblastenproliferation mit nachfolgender tubulointerstitieller Fibrose (MA et al. 1998). Nach UUO wird die Produktion von

Angiotensin II stimuliert, was die Upregulation anderer Faktoren wie beispielsweise TGF- β , TNF- α und verschiedener Matrixproteine zur Folge hat (GUO et al. 1999). Des weiteren kommt es nach UUO zu einer Vermehrung der Kollagene I, III und IV sowie zu einer erhöhten Expression von mRNA der α 1-Monomere dieser Kollagene (SHARMA et al. 1993). Bis zum 4. Tag nach UUO kam es in der Studie von NAGLER et al. (1973) zu keinem kompensatorischen Anstieg der GFR der kontralateralen Niere. MA et al. (1998) konnten in der kontralateralen Niere keine interstitielle Fibrose und keine Veränderungen des interstitiellen Kollagens feststellen.

2.3.4 5/6 Nephrektomie (5/6 NX)

Die 5/6 NX wird meist in 2 Schritten durchgeführt. In der ersten Operation wird eine Niere zu 2/3 entfernt. Einige Tage später erfolgt die Entnahme der kontralateralen Niere. Die Parenchymreduktion induziert nach einem primär akuten Nierenversagen strukturelle und funktionelle Anpassungsvorgänge, die in eine chronische Niereninsuffizienz übergehen können. FARAJ und MORLEY (1992) beschrieben nach 5/6 NX einen Anstieg des systolischen Blutdrucks auf 200mmHg innerhalb von 12 Wochen, wohingegen der Blutdruck bei scheinoperierten Ratten zwischen 102 und 126mmHg lag. Die Untersuchung der Plasmakreatininkonzentration und der Proteinausscheidung im Harn ließen auf Kompensationsvorgänge im verbleibenden Nierenparenchym schließen. Strukturelle Veränderungen in Form einer Glomerulosklerose, einer tubulären Atrophie, einer interstitiellen Nierenfibrose und einer vaskulären Anpassung an die Hypertonie konnten gezeigt werden. Die nach Parenchymreduktion verbliebenen intakten Nephrone hypertrophierten. In einer anderen Studie (KAUFMAN et al. 1974) kam es 4 Wochen nach uNX zu einer Zunahme des Gewichtes der verbliebenen Niere (NG) um ca. 80%. Nach Entnahme von 75% des Nierengewebes wurde eine Zunahme des NG der in situ belassenen Niere um mehr als 150% beschrieben. Nach einer Schein-OP nahm das NG lediglich altersbedingt um ca. 25% in 4 Wochen zu (FLECK und BRÄUNLICH 1984). HAMAR et al. (1999) beschrieben 12 Wochen nach 5/6 NX funktionelle Veränderungen mit manifester Proteinurie, erhöhter Serumkreatininkonzentration und erniedrigter Kreatininclearance sowie einem erhöhten Blutdruck. AMANN et al. (1997) konnten 8 Wochen nach 5/6 NX eine signifikante Reduktion des Körpergewichts um 13%, einen signifikant erhöhten Blutdruck ($128 \pm 8,47$ und 109 ± 11 mmHg) sowie eine erhöhte Serumkreatininkonzentration im Vergleich zu Kontrollratten nachweisen.

2.3.5 Applikation von Nephrotoxinen

Der Anteil toxisch bedingter Nierenerkrankungen liegt beim Menschen etwa bei 20%, wobei vor allem die Analgetikanephropathie eine große Rolle spielt. Aus verschiedenen Gründen besteht eine erhebliche Vulnerabilität der Nieren durch toxische Substanzen. Auf Grund von Sekretions- und Reabsorptionsvorgängen kommt es zu einer Anreicherung von Nephrotoxinen im Tubulusepithel. Eine Schädigung der Tubuluszellen ist die Folge. Es kann zu akutem und chronischem Nierenversagen, sowie zu einem nephrotischen Syndrom nach Applikation von verschiedenen toxischen Substanzen kommen. Neben zahlreichen Medikamenten zählen auch Schwermetalle zu potentiellen Nephrotoxinen (SCHRAMM und GALLE 1998). Anorganisches Quecksilber ruft beispielsweise Nekrosen der Hauptstückepithelien der Nieren hervor, wobei die Dosis das Ausmaß der Schädigung bestimmt (GRÖNE und THOMAS 1996). Eine Reduktion der GFR ist für Cisplatin und Chromat beschrieben, Thallium bewirkt akut eine noch stärkere Einschränkung der GFR (FLECK 1999). Auch Uran zählt als Uranylнитrat (UN) zu den Nephrotoxinen. BLANTZ (1975) beschrieb bei Ratten nach Applikation von 1,5 bzw. 2,5mg UN/100g KG eine kurze polyurische Phase, gefolgt von einer progressiven Oligurie, die nach 5 Tagen mit dem Tod endete. Die GFR erreichte zwei Stunden nach Gabe der niedrigeren Dosis UN 47% des Wertes der Kontrolltiere, bzw. 21% nach Gabe der höheren Dosis. HALEY et al. (1982) induzierten mit einer einmaligen Dosis von 1,0mg UN/100g KG s.c. eine Reduktion der GFR. Eine Woche nach Applikation von UN betrug die GFR nur 18% des Wertes der Kontrollgruppe, zwei Wochen nach Applikation von 1,0mg UN/100g KG sank die GFR auf etwa 53% des Wertes der Kontrolltiere. Allerdings war die gewählte hohe Dosierung mit einer Mortalitätsrate von 60% belastet. Im Verlauf von acht Wochen entwickelte sich eine interstitielle Fibrose mit Infiltration von mononukleären Zellen. Die Auswirkungen von UN auf die Nierenfunktion und Morphologie zeigen Unterschiede zu anderen Schwermetallen in Bezug auf die akute Reaktion sowie auf die Dauer und das Ausmaß der Schädigung. In einer anderen Studie beschrieb HALEY (1982) 5 Tage nach UN-Applikation histologisch eine akute tubuläre Nekrose, wobei die Nierenfunktion noch minimal erhalten war. UN bewirkt in hoher Dosis somit ein akutes Nierenversagen mit einer langsamen Erholungsphase und langfristig anhaltenden pathologischen Läsionen (HALEY et al. 1982).

2.4 Nierenfibrose

Die Nierenfibrose ist das Resultat unterschiedlicher Nierenerkrankungen, die letztendlich zu einem chronischen Nierenversagen führen (OKADA et al. 1996 b). Der Begriff Fibrose ist in Bezug auf parenchymatöse Organe definiert als relative Vermehrung der bindegewebigen Anteile im Vergleich zur Anzahl an organspezifischen Zellen, wobei vor allem extrazelluläre Komponenten in Form von Kollagen für die strukturellen Veränderungen verantwortlich sind. Eine Fibrose ist das Resultat einer der folgenden Mechanismen (GONZÁLEZ-AVILA et al. 1988):

- Destruktion des Stromas und Verschwinden des funktionsfähigen Parenchyms,
- Vermehrte Synthese und/oder langsamerer Abbau von bindegewebigen Komponenten,
- Kombination von beiden Prozessen.

Dabei stellen die erhöhte Proliferation von Fibroblasten sowie die zunehmende Ablagerung von extrazellulärer Matrix wesentliche Kriterien der interstitiellen Nierenfibrose dar (STRUTZ und MÜLLER 1999). Der ätiologische Grundmechanismus von Fibrosen besteht in einer unkontrollierten Kollagensynthese mit erhöhter Aktivität der Lysinhydroxylase, die an der Bildung von Prokollagen beteiligt ist. Gleichzeitig ist die Kollagenaseaktivität vermindert. Der Kollagenabbau wird zusätzlich erschwert durch den hohen Vernetzungsgrad der Kollagenmoleküle und den hohen Anteil an Kollagen Typ III. Mitbeteiligte Zellen sind Fibroblasten bzw. Myofibroblasten. Durch den vermehrten Anteil an Kollagenfasern entsteht makroskopisch eine Verhärtung der betroffenen Struktur. Dem geht eine Gewebeschädigung als Folge chronisch-entzündlicher, ischämischer oder degenerativer Prozesse voraus (RIEDE und ROHRBACH 1989).

Das allmählich eintretende Nierenversagen geht mit Ablagerung von Kollagenen einher. Es gibt Mediatoren, die für diese Veränderungen mitverantwortlich gemacht werden und welche die narbige Umgestaltung der Nieren forcieren, wie beispielsweise Angiotensin II, Endothelin-1 und TGF- β . Charakteristisch ist das oben beschriebene Schrumpfen der fibrosierten Nieren, das möglicherweise auf die Kontraktion von Myofibroblasten zurückzuführen ist (YAMAMOTO et al. 1994; COHEN 1995). Die Proliferation von Fibroblasten und die vermehrte Produktion von Matrixproteinen führt zu einer fortschreitenden renalen Fibrose (SHARPE et al. 1999). Ursächlich für die Entwicklung einer renalen Fibrose, die im Extremfall bis zum Endstadium eines chronischen Nierenversagens fortschreitet, ist eine initiale entzündliche Reaktion (BAUD et al. 1999). In Frühstadien von Nierenerkrankungen unterschiedlicher Genese kommt es durch einwandernde, aktivierte Makrophagen zu einer verstärkten TGF- β -Ausschüttung. Dieser Wachstumsfaktor ist

physiologischerweise an der Gewebsregeneration beteiligt und bewirkt daher bei überschießender Freisetzung eine massive Neubildung von extrazellulärer Matrix und führt so zur Glomerulosklerose. Eine starke Expression von TGF- β ist also mit einer fortschreitenden Fibrosierung verbunden, wobei die Wirkung von TGF- β durch andere Wachstumsfaktoren wie PDGF unterstützt wird und es so zu einem Circulus vitiosus kommt (GÖTZ 1995). Die Expression von TGF- β kann außer in Makrophagen auch in anderen Zellen wie beispielsweise Tubuluszellen oder Fibroblasten im renalen Interstitium beobachtet werden (OKADA et al. 1996 a). Die chronisch verlaufende Niereninsuffizienz ist histologisch als progrediente narbige Umgestaltung der Nieren zu erkennen. Außer der Glomerulosklerose kann sich auch eine tubulointerstitielle Fibrose und im Bereich der Gefäße eine Hyalinose und Sklerose entwickeln. Im Folgenden soll auf die einzelnen Stadien näher eingegangen werden.

2.4.1 Glomerulosklerose

Die fortschreitende Sklerose und Fibrose der Glomeruli bedingt einen Verlust an Filtrationsfläche und somit auch einen Verlust der physiologischen Filtrationsfunktion. Die initiale Schädigung kann sowohl glomeruläre, tubulointerstitielle als auch vaskuläre Ursachen haben (EL NAHAS et al. 1997). Zu Beginn kommt es zur Interaktion von glomerulären Zellen mit infiltrierenden Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten. Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF und TGF- β werden freigesetzt und bewirken eine Synthese von Extrazellulärmatrix, wodurch eine Glomerulosklerose initiiert wird (BAUD et al. 1999). Reversibel bleibt die Glomerulosklerose, wenn keine zusätzlichen interstitiellen oder vaskulären Schäden vorliegen. Ein fortschreitender Prozeß bleibt selten auf die Glomeruli begrenzt. Eine Glomerulosklerose ist daher sehr oft begleitet von der Entwicklung einer progressiven Fibrose im tubulointerstitiellen Bereich der Niere. Die Glomerulosklerose führt über eine sekundäre tubuläre Ischämie zu tubulointerstitiellen Veränderungen (EL NAHAS 1995). Einschränkungen der Nierenfunktion korrelieren daher eher mit der Ausprägung einer tubulointerstitiellen Fibrose als mit der anfänglichen Glomerulosklerose (YAMAMOTO et al. 1994; SOMMER et al. 1999).

2.4.2 Tubulointerstitielle Fibrose

Ist im Gefolge einer Glomerulosklerose ein Tubulusschaden eingetreten, setzt dieser eine irreversible tubulointerstitielle Fibrosierung in Gang, die sekundär zu einem vollständigen Verlust der glomerulären Funktion führt (ONG und FINE 1994). Für die Prognose sind Veränderungen im tubulointerstitiellen Bereich von größerer Bedeutung. Nach BAUD et al.

(1999) wird die tubulointerstitielle Sklerose von entzündlichen Veränderungen im Glomerulum induziert, die letztendlich zu einer Proteinurie führen. KLIEM et al. (1996) zeigten in ihrer Studie nach 5/6 NX eine frühe, vorübergehende Zellproliferation der kortikalen tubulointerstitiellen Zellen, die vor allem im proximalen, aber auch im distalen Tubulus und in den Sammelrohren zu finden sind. Außerdem fiel eine tubulointerstitielle Infiltration von Monozyten und Makrophagen auf, ebenso wie die Anreicherung von verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen. Des weiteren beschrieben sie eine vermehrte tubulointerstitielle Produktion von B-Ketten des PDGF und der β -Untereinheiten von PDGF-Rezeptoren. Die Anreicherung von Monozyten und Makrophagen spielt demnach eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Fibrose. Tubuläre Zellen können direkt zur Aktivierung und Proliferation von renalen interstitiellen Fibroblasten durch die Ausschüttung von IL-1 und TGF- β führen (ONG und FINE 1994; LONNEMANN et al. 1995). KUNCIO et al. (1991) unterteilten die Entstehung einer tubulointerstitiellen Fibrose in drei Phasen:

- Phase 1 (Induktion) schafft die notwendigen Bedingungen einer Fibrogenese und der Proliferation von Fibroblasten durch Aktivierung von Makrophagen und Freisetzung von Cytokinen.
- In Phase 2 (Matrixablagerung) wird eine chronische Entzündung aufrechterhalten, wobei es zur Synthese, Sekretion und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen, z.B. Kollagen Typ I und III oder Fibronektin, kommt.
- Phase 3 (Resolution) bedeutet eine Beendigung der Entzündungsreaktion und nach vollständigem Parenchymbau das Ende der Fibrogenese.

2.4.3 Vaskuläre Sklerose

Eine vaskuläre Sklerose tritt bei verschiedenen Nierenerkrankungen auf. Dabei kommt es zu einer Verdickung und Hyalinisierung der arteriolären Gefäßwände. Das bedingt sekundär eine glomeruläre und tubuläre Ischämie (EL NAHAS 1995). Die Entwicklung einer Nierenfibrose umfaßt also Interaktionen von glomerulären, tubulointerstitiellen und vaskulären Strukturen. Eine Ischämie der Niere führt zu einer Atrophie mit komplexen angiosklerotischen Läsionen, die sekundär die interstitielle Nierenfibrose bedingen (MEYRIER 1999).

2.5 Therapeutische Beeinflussung der Nierenfibrose

Eine Nierenfibrose ist häufig das Endstadium verschiedener Nierenerkrankungen und erfordert schließlich eine Nierenersatztherapie oder -transplantation. Man sucht deshalb nach Möglichkeiten der Prävention und Therapie. Allgemeine und symptomatische Maßnahmen wie eiweißarme Diät und die Behandlung einer Hyperlipidämie, eines Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie sind obligat. BECKER und HEWITSON (1997) beschrieben beispielsweise eine verminderte Entstehung einer Glomerulosklerose durch den Effekt von ACE-Hemmern. Andere Ansätze stellen die Hemmung von TGF- β und PDGF durch neutralisierende Antikörper und die Hemmung der Produktion von Extrazellulärmatrix dar (STRUTZ und MÜLLER 1996).

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Untersuchungen auf folgende zwei Substanzen beschränkt:

- Den PDGF-Antagonisten Ag 1295 und
- den Kollagen-Synthese-Hemmer Halofuginone (Halo).

2.5.1 Ag 1295

PDGF ist ein von Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildeter Wachstumsfaktor, der bei der Zellproliferation und Wundheilung vermehrt freigesetzt wird. So sind der PDGF und die Expression von PDGF-Rezeptoren wichtig für zahlreiche physiologische Prozesse. Eine abnorm hohe Aktivität von PDGF spielt eine zentrale Rolle bei der Arteriosklerose, der Lungenfibrose und der glomerulären Nephritis (KOVALENKO et al. 1994). Der PDGF verstärkt außerdem die Wirkung von TGF- β und fördert somit zusätzlich die Entstehung einer Fibrose (GÖTZ 1995). JOHNSON et al. (1992) beschrieben einen protektiven Effekt auf die Entstehung einer experimentellen Glomerulonephritis nach Applikation von PDGF-neutralisierenden Antikörpern. Ag 1295 ist ein Tyrosinkinase-Blocker, der hochselektiv die PDGF-Rezeptorkinase, sowie die PDGF-abhängige DNA-Synthese hemmt. Ag 1295 hebt die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors vollständig auf, wogegen es keine Auswirkungen auf den epidermalen Wachstumsfaktor hat. Im Vergleich von Ag 1295 mit anderen Substanzen aus der Stoffgruppe gibt es vor allem Unterschiede in der Selektivität. Die hohe Selektivität von Ag 1295 in Bezug auf den PDGF läßt jedoch außer acht, daß die Tyrosinkinasen, die in die intrazelluläre Signalübertragung involviert sind, auch von anderen Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Durch Ag 1295 soll der Versuch unternommen werden, die Fibroseentstehung zu hemmen bzw. ganz zu unterbinden.

2.5.2 Halofuginone

Kollagen ist physiologischer Bestandteil vieler Gewebe wie zum Beispiel Knochen, Haut und Sehnen. Außerdem spielt die Synthese von Kollagen, die vor allem durch Fibroblasten ausgelöst wird, eine wichtige Rolle bei der Bildung von extrazellulärer Matrix, die verstärkt vor allem in fibrotischen Läsionen gefunden werden kann. Es kommt zu einer vermehrten Produktion von Kollagen Typ I, in einigen Fällen auch verbunden mit einer Zunahme von Kollagen Typ III. Kollagen Typ I besteht aus jeweils zwei α 1-Ketten und einer einzelnen β 1-Kette (RIEDE und ROHRBACH 1989). Kollagen Typ III besteht dahingegen aus drei α 1-Ketten (LEONHARDT 1990 a).

Die Substanz Halofuginone, ein Alkaloid aus der Pflanze *Dichroa febrifuga* aus der Familie der Hortensiengewächse, hemmt die Genexpression der α 1-Kette des Kollagen I und somit die Kollagensynthese in verschiedenen Zellen, unter anderem auch in Fibroblasten, schon in niedriger Dosierung (PINES und NAGLER 1998). Die Substanz kann oral und lokal verabreicht werden beziehungsweise am Versuchstier auch mittels intraperitonealer Injektion. NAGLER et al. (1999) beschrieben Halo als spezifischen Hemmer der Kollagen Typ I-Synthese, der eine dosisabhängige Hemmung der Kollagensynthese induziert. Sie führten Versuche an Ratten mit unterschiedlichen Dosierungen durch, um nach vorausgegangener Induktion der Kollagensynthese durch eine Operation und Verletzung eines Uterushorns den postoperativen Grad von Adhäsionen nach 2-3 Wochen zu bestimmen. Die Dosis für die intraperitoneale Gabe lag zwischen 0,4 und 4,0 μ g/100g KG. Es ließ sich eine dosisabhängige Reduktion der Ausbildung von Adhäsionen im Operationsgebiet nachweisen. Interessanterweise blieb die Wundheilung nahezu unbeeinträchtigt. Aus weiterführenden Studien ist bekannt, daß Halo nur auf die Neusynthese von Kollagen hemmend wirkt. Bei schon abgelagertem Kollagen ist seine Wirkung kaum nachweisbar (PINES und NAGLER 1998). Fibroblasten sezernieren im Rahmen von Entzündungsprozessen Wachstumsfaktoren, beispielsweise TGF- β , welche die Kollagensynthese induzieren. Auch diese durch TGF- β bedingte Kollagensynthese wird durch Halo gehemmt. Der Vorteil von Halo liegt in der spezifischen, gewebeunabhängigen Hemmung der Kollagen Typ I-Synthese durch verminderte Genexpression. Dabei sind schon sehr geringe Dosierungen wirksam (GRANOT et al. 1993).

3 Ziele der Arbeit

Das Endstadium eines chronischen Nierenversagens ist oftmals mit der Entwicklung einer Nierenfibrose verbunden, ohne daß sich die eigentliche Ätiologie dieses Prozesses erkennen läßt (NG et al. 1998; SOMMER et al. 1999). Bei vielen glomerulären und interstitiellen Erkrankungen sind die zugrundeliegenden Ursachen noch unbekannt. Gezielte therapeutische Maßnahmen sind daher nicht möglich. Die chronische Niereninsuffizienz wird in Zukunft ein zunehmendes Gesundheitsproblem darstellen, da sie immer häufiger auftritt und immer höhere Kosten vor allem im Rahmen der Nierenersatztherapie verursacht (LEGRAIN und JACOBS 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein geeignetes Tiermodell mit funktionellen und strukturellen Veränderungen der Niere zu finden, die einer Nierenfibrose des Menschen möglichst ähnlich sind, um Möglichkeiten der Prävention bzw. Therapie der interstitiellen Nierenfibrose zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit sollten drei verschiedene Tiermodelle zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose bei Ratten verglichen werden:

- Die temporäre warme Ischämie,
- die 5/6 NX und
- die einmalige UN-Applikation.

Eine temporäre warme Ischämie einer Niere führt bei zusätzlicher uNX der Gegenseite durch den Verlust von 50% der Nephronen zu funktionellen und strukturellen Veränderungen des verbliebenen Nierengewebes (AZUMA et al. 1997).

KLIEM et al. (1996) beschrieben bei 5/6 nephrektomierten Ratten die Entwicklung einer Proteinurie sowie einen progressiven tubulointerstitiellen Nierenschaden, der zur interstitiellen Nierenfibrose führt.

Eine Schädigung der Nieren wird nach Applikation von verschiedenen Nephrotoxinen beobachtet. UN erzeugt nach einmaliger Gabe ein akutes Nierenversagen mit langsamer Regeneration und irreversiblen Veränderungen der Morphologie der Nieren als Spätfolge.

Um die Fibrosierung zu verhindern, wurden Ag 1295 und Halofuginone angewendet:

Ag 1295 ist ein selektiver Hemmer der PDGF-Rezeptorkinase und der PDGF-abhängigen DNA-Synthese. Eine Fibrogenese ist nicht nur Folge erhöhter Matrixproduktion pro Zelle, sondern auch Resultat einer Vermehrung der Zellen. Die Fibroblastenproduktion wird durch PDGF angeregt. Ein möglicher Therapieansatz ist es daher, die PDGF-Rezeptorkinase zu blocken und somit den fibroseinitiiierenden Mechanismus zu unterbinden (MÜLLER et al. 1996).

Kollagen ist wesentlicher Bestandteil der Extrazellulärmatrix in fibrotischen Arealen. Daher setzten wir für unsere Untersuchungen Halo ein, einen Hemmer der Kollagen-Typ-I-Synthese, um die Entstehung einer Nierenfibrose zu verhindern.

Beide Substanzen wurden sowohl auf ihre eigene Nephrotoxizität, als auch auf ihre Wirkung zur Prävention einer Nierenfibrose untersucht.

Halo wurde zusätzlich auf die Wirksamkeit bei bereits beginnender Nierenfibrose getestet.

Ziel der Arbeit war es, eine Substanz zu finden, die in der Prävention und/oder der Therapie einer Nierenfibrose erfolgreich ist und dieses sowohl laborchemisch, als auch histologisch nachzuweisen.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an erwachsenen weiblichen Wistarratten (Han:Wist) aus dem Aufzuchtstamm des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Das durchschnittliche Körpergewicht zu Beginn der Untersuchungen betrug $159 \pm 2\text{g}$.

Die Haltung der Ratten erfolgte in Gruppen zu je 6 Tieren in Käfigen der Größe 35cm x 55cm x 18cm bei einer Raumtemperatur von 20-25°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50% und einem 12h/12h Hell-Dunkel-Rhythmus. Sie erhielten Standardfutter (Altromin 1316, Altromin GmbH Laage, BRD) und Wasser ad libitum. Granulat (Altromin GmbH Laage, BRD) wurde als Einstreu verwendet.

Die Genehmigung der Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen zur Durchführung der Versuche lag vor (Reg.-Nr. 02-02/98).

4.2 Versuchsdurchführung

4.2.1 Narkose

Zur Narkotisierung der Versuchstiere für die 5/6 NX und für die Erzeugung der temporären Ischämie wurde Hexobarbital (Hexobarbital-Natrium®, Arzneimittelwerk Dresden, BRD) in einer Dosis von 10mg/100g KG, gelöst in 1ml destilliertem Wasser, intraperitoneal (i.p.) injiziert.

Die i.p. Injektion von UN, Halofuginone und Ag1295 ist nur wenig schmerzhaft und wurde daher ohne Narkose durchgeführt.

Die Tötung der Tiere zur Gewinnung von Serum für die Kreatininbestimmung sowie zur Entnahme der Nieren für die OH-Prolinbestimmung und die morphologischen Untersuchungen erfolgte durch Dekapitation in Ethernarkose.

4.2.2 Diureseversuch und Harngewinnung

Die Untersuchung erfolgte ohne Volumenbelastung an wachen Tieren, die für die einstündige Harnsammelperiode in Diuresekäfigen saßen. Während dieser Zeit konnten die Tiere weder Wasser noch Nahrung zu sich nehmen. Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere gewogen, die Harnblase der Ratten wurde durch einen leichten suprapubischen Druck entleert, der Harn wurde verworfen. Daraufhin wurden die Ratten einzeln in Diuresekäfigen auf ein Drahtsieb gesetzt. Dieses verhindert die Verunreinigung der Urinproben mit Kot. Der Harn wurde in Glaszentrifugenröhrchen mit Spitzboden aufgefangen. Nach Ablauf von 60 Minuten wurde

die Blase der Tiere erneut mittels manuellem suprapubischem Druck vollständig entleert, der gesammelte Urin entnommen, seine Menge volumetrisch für die Protein- und Kreatininbestimmung gemessen und für die weiteren Untersuchungen (siehe nachfolgend) bei -20°C aufbewahrt.

4.2.3 Serumgewinnung

Die Ratten wurden in Ethernarkose durch Dekapitation getötet und das Blut in Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Diese wurden in einer Zentrifuge (Typ T23, Zentrifugenbau Engelsdorf/Leipzig, BRD) bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, das Serum für die Kreatininbestimmung gewonnen und bis zur Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

4.2.4 Entnahme der Nieren

Die Tiere wurden wie oben beschrieben getötet. Danach wurde der Retroperitonealraum eröffnet, die linke Niere aufgesucht, mobilisiert und die Nierenkapsel entfernt. Daraufhin wurde die Niere entnommen und für die OH-Prolinbestimmung sowie für die morphologische Untersuchung, wie unten beschrieben (siehe 4.4.5 und 4.4.6), vorbereitet.

4.3 Versuchsgruppen

4.3.1 Temporäre warme Ischämie (Isch)

Nach Entfernung des Fells der narkotisierten Ratte im OP-Gebiet wurde die Bauchhöhle durch einen ventralen Medianschnitt eröffnet und die linke Niere freigelegt. Die Blutzufuhr der linken Niere wurde für 20min (**Isch 20**), bzw. für 45min (**Isch 45**) durch Ligatur der A. renalis unterbrochen. Um eine Verletzung der A. renalis zu vermeiden, wurde der für die Ligatur verwendete Faden über einem Silikongummistück verknotet. Durch dieses Vorgehen war es auch leichter möglich, die Ligatur wieder zu entfernen. Während der Ischämie lagen die Tiere auf einem beheizten Operationstisch (37°C) und die offene Bauchhöhle war mit feuchten warmen Tüchern abgedeckt, so daß die Körpertemperatur konstant blieb. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde die Ligatur gelöst und die Operationswunde schichtweise mit herkömmlichem Nahtmaterial geschlossen. Zur Wundabdeckung wurde Ankerplastspray (Ankerpharm GmbH, Rudolstadt, BRD) verwendet. Der postoperative Verlauf gestaltete sich problemlos, die Tiere wachten nach ca. einer Stunde auf und erholten sich rasch.

Nach einem Tag Adaptationszeit wurde die rechte Niere, nach Unterbindung des Nierenhilus, in Hexobarbitalnarkose entnommen. Dazu wurde das Fell über dem rechten Nierenlager

entfernt, die Bauchhöhle durch einen dorsalen Rippenbogenrandschnitt eröffnet und die Niere entnommen. Der Wundverschluß wurde analog zur Ischämie vorgenommen.

Als Kontrolltiere (**Ko Isch**) dienten Ratten, deren Bauchhöhle in Narkose eröffnet wurde, um die Niere frei zu legen. Jedoch wurde die Blutzufuhr nicht unterbrochen. Nach 45min, in denen auch diese Tiere auf dem beheizten Operationstisch lagen und die offene Bauchhöhle mit feuchten Tüchern abgedeckt war, wurde die Operationswunde wie geschildert schichtweise vernäht. Einen Tag später wurden die Kontrolltiere erneut mit Hexobarbital narkotisiert und der Bauchraum eröffnet, um die rechte Niere in der oben beschriebenen Vorgehensweise zu entfernen. Bei den Tieren der Gruppe Ko Isch handelt es sich somit um Ratten, die einer uNX unterzogen worden sind.

Nach 8, 12, 16 und 20 Wochen wurde mit 3-7 Versuchs- bzw. Kontrolltieren ein Diureseversuch durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die Tiere in Ethernarkose durch Dekapitation getötet, das Serum zur Kreatininbestimmung gewonnen, die Niere entnommen und für die morphologische Untersuchung sowie für die OH-Prolinbestimmung, wie unten beschrieben, vorbereitet.

4.3.2 5/6 Nephrektomie (5/6 NX)

Nach Entfernung des Fells der hexobarbitalnarkotisierten Ratte im OP-Gebiet wurde der Retroperitonealraum unterhalb des linken Rippenbogens dorsolateral eröffnet, die Niere aufgesucht, mobilisiert und die Nierenkapsel mit Hilfe einer Pinzette atraumatisch gelöst. Die Nierenrinde und die Nierenpole wurden mittels einer Schere abgeschnitten (2/3 NX) und die entstandene Wundflächen mit Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun, Melsungen, BRD) verschlossen. Daraufhin erfolgte der schichtweise Wundverschluß mit herkömmlichem Nahtmaterial. Ankerplastspray wurde zur Wundabdeckung verwendet. Nach ca. 30min erwachten die Tiere aus der Narkose. Der Zustand der Ratten stabilisierte sich postoperativ weiterhin rasch.

Nach einer Adaptationszeit von 3 Tagen wurde den Tieren, wiederum in Hexobarbitalnarkose, der Retroperitonealraum auf der rechten Seite wie beschrieben eröffnet. Die rechte Niere wurde nach Unterbindung des Nierenhilus entfernt. Danach erfolgte wie bei der Nierenrindenresektion der schichtweise Wundverschluß.

Als Kontrolle für die 5/6 NX dienten zwei Scheinoperationen (**Ko NX**). Dazu wurde die Bauchhöhle der Tiere in Hexobarbitalnarkose am Tag 1 und nach 4 Tagen lediglich eröffnet und wie beschrieben verschlossen. Die Tiere der Gruppe Ko NX erhielten somit keine Nephrektomie, sie hatten zu jedem Versuchszeitpunkt beide Nieren.

1, 4, 8, 10 und 20 Wochen nach dem Eingriff wurde mit 3-6 Versuchs- bzw. Kontrolltieren ein Diureseversuch durchgeführt. Danach wurden die Tiere in Ethernarkose zur Gewinnung von Serum, das zur Bestimmung von Kreatinin benötigt wurde, dekapitiert,. Außerdem wurde die Niere entnommen und für die morphologischen Untersuchungen bzw. die OH-Prolinbestimmung vorbereitet.

4.3.3 Uranylinitrat (UN)

Den Versuchstieren wurde einmalig eine Dosis von 0,3mg UN/100g KG (**UN 0,3**) bzw. 0,5mg UN/100g KG (**UN 0,5**) in einem Volumen von 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG i.p. verabreicht.

Den Kontrolltieren (**Ko UN**) wurde einmalig 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p. appliziert.

Nach 2, 4, 8, 10 und 20 Wochen wurde mit jeweils 3-6 Versuchs- bzw. Kontrolltieren ein Diureseversuch durchgeführt. Danach wurden die Tiere in Ethernarkose durch Dekapitation getötet. Das Serum wurde zur Bestimmung von Kreatinin gewonnen und die Niere entnommen, um sie für die morphologischen Untersuchungen und die OH-Prolinbestimmung zu nutzen.

4.3.4 Ag 1295

Die Nierenfibrose wurde durch die einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in einem Volumen von 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG induziert. Zur Beeinflussung der Nierenfibrose wurden täglich 1,2mg Ag 1295/100g KG (**UN 0,5 + Ag 1295**) in einem Volumen von 0,5ml 1%-iger Tylose/100g KG suspendiert und i.p. injiziert. Die erste Injektion mit Ag 1295 (Synthos Mazkeret Batia, Israel) erfolgte einen Tag vor der UN-Gabe, es folgten weitere tägliche Injektionen über die kommenden 2 Wochen nach UN-Injektion.

Als Kontrolle wurden die Tiere lediglich mit Ag 1295 behandelt (**Ko Ag 1295**): Den Tieren wurde täglich 1,2mg Ag 1295/100g KG in einem Volumen von 0,5ml 1%-iger Tylose/100g KG i.p. appliziert. Die Behandlung erfolgte über 2 Wochen. Am 2. Tag der Ag 1295-Injektionen wurde den Kontrolltieren einmalig 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p. gespritzt, um die UN-Injektion zu simulieren.

2, 7 und 10 Tage sowie 2 und 4 Wochen nach der ersten Ag 1295-Injektion wurde mit 3-6 Tieren der Kontrollgruppe (Ko Ag 1295) und an den selben Terminen sowie zusätzlich in der 8., 10. und 20. Woche nach der UN-Injektion mit 3-6 Versuchstieren (UN 0,5 + Ag 1295) ein

Diureseversuch durchgeführt. Der weitere Versuchsablauf entsprach der unter 4.3.3 beschriebenen Vorgehensweise.

4.3.5 Halofuginone (Halo)

In der ersten Tiergruppe (**UN 0,5 + Halo I**) wurde die Nierenfibrose durch die einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in einem Volumen von 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG induziert. Zusätzlich wurde der Kollagensynthesehemmer Halo (Roussel Uclaf, Paris, France) in einer Dosis von 4µg/100g KG in einem Volumen von 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG täglich i.p. injiziert. Die erste Injektion wurde einen Tag vor der UN-Gabe verabreicht, daraufhin täglich bis zum Ende des Versuches (=20 Wochen).

Bei einer zweiten Versuchstiergruppe (**UN 0,5 + Halo II**) wurde auf dieselbe Art wie zuvor beschrieben eine Nierenfibrose erzeugt. Halo wurde in gleicher Dosierung wie bei der Versuchstiergruppe UN 0,5 + Halo I ab dem 10. Tag nach der einmaligen UN-Injektion (=Ende der akuten Phase) bis zum Ende des Versuches (=20 Wochen nach UN) täglich i.p. gespritzt.

Um nähere Erkenntnisse über die alleinige Wirkung von Halo auf die Niere zu bekommen, wurde einer Kontrollgruppe (**Ko Halo**) täglich nur Halo injiziert: Mit oben genannter Dosis wurde den Tieren täglich über 20 Wochen der Kollagensynthesehemmer verabreicht. Auch diesen Tieren wurde am 2. Tag nach Beginn der Injektionen mit Halo einmalig 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p. gespritzt, um die UN-Injektion zu simulieren.

2, 7 und 10 Tage sowie 2, 4, 8, 10 und 20 Wochen nach der UN-Gabe (UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II), bzw. nach der ersten Halo-Injektion (Ko Halo) wurde mit 3-7 Versuchs- (UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II) bzw. Kontrolltieren ein Diureseversuch durchgeführt. Danach wurde wie unter 4.3.3 beschrieben vorgegangen.

4.3.6 Zusammenstellung aller Versuchsgruppen

Tab. A: Übersicht der durchgeführten Versuche

Versuchsgruppen Ischämie

Versuchsgruppen	1. Tag des Versuches	2. Tag des Versuches
Ko Isch	Schein-Operation: keine Unterbrechung der Blutzufuhr	Nephrektomie rechts
Isch 20	20 min warme Ischämie der linken Niere	Nephrektomie rechts
Isch 45	45 min warme Ischämie der linken Niere	Nephrektomie rechts

Versuchsgruppen 5/6 Nephrektomie

Versuchsgruppen	1. Tag des Versuches	4. Tag des Versuches
Ko NX	Schein-Operation: Eröffnung der Bauchhöhle ohne Entnahme von Nierengewebe	Schein-Operation: Eröffnung der Bauchhöhle ohne Entnahme von Nierengewebe
5/6 NX	2/3 Entfernung der linken Niere	Nephrektomie rechts

Versuchsgruppen Uranylнитrat

Versuchsgruppen	1. Tag des Versuches
Ko UN	einmalige i.p. Injektion von 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG
UN 0,3	einmalige i.p. Injektion von 0,3mg UN/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG
UN 0,5	einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG

Versuchsgruppen Ag 1295

Versuchsgruppen	täglich über 2 Wochen nach Versuchsbeginn	2. Tag des Versuches
Ko Ag 1295	Injektion von 1,2mg Ag 1295/100g KG in 0,5ml 1%- iger Tylose/100g KG i.p.	einmalige i.p. Injektion von 5ml 0,9%-iger NaCl- Lösung/100g KG
UN 0,5 + Ag 1295	Injektion von 1,2mg Ag 1295/100g KG in 0,5ml 1%- iger Tylose/100g KG i.p.	einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG

Versuchsgruppen Halofuginone

Versuchsgruppen	täglich bis Versuchsende nach 20 Wochen	2. Tag des Versuches
Ko Halo	Injektion von 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p.	einmalige i.p. Injektion von 5ml 0,9%-iger NaCl- Lösung/100g KG
UN 0,5 + Halo I	Injektion von 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p.	einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG
UN 0,5 + Halo II	Injektion von 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p. Beginn 10 Tage nach UN-Gabe	einmalige i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG

4.4 Bestimmungsmethoden

4.4.1 Bestimmung des Körpergewichts

Die Ratten wurden auf einer Waage (Accurat 2000 von WEDO, Werner Dorsch GmbH, Rödermark, BRD) gewogen.

4.4.2 Bestimmung des Harnvolumens

Nach der Harngewinnung (siehe Abschnitt 4.2.2) wurde das Volumen des Harns mittels einer 1ml Präzisionsglasspritze (Original Rekord Metall-Glas-Spritze, Injekta, Steinach, BRD) bestimmt.

Anschließend wurde das Harnvolumen pro Stunde bezogen auf das Körpergewicht errechnet.

4.4.3 Bestimmung der Kreatininkonzentration

Die Kreatininkonzentration wurde durch das SYNCHRON® LX-System mittels einer kinetischen Jaffé-Methode bestimmt:

In ein Reaktionsgefäß, das mit alkalischer Pikratlösung gefüllt war, wurden entweder 16,5µl Serum oder 5,5µl Urin injiziert. Das ergab eine Verdünnung von 1:35 für die Serumproben bzw. 1:105 für die Urinproben. Durch die Verbindung des Kreatinins mit dem Reagenz entstand ein rot-oranger Farbkomplex (NARAYANAN u. APPLETON, 1980; SPENCER, 1986). 19 und 25 Sekunden nach der Probeninjektion wurde bei 520nm die Extinktion abgelesen.

Durch Zugrundelegen der Kreatinin-Werte in Serum und Urin erfolgte die Berechnung (Formel 1, siehe Kap. 4.5) der Kreatininclearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR).

4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin

Die Proteinbestimmung im Urin wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip einer Bindung von Protein an Serva-Blau G-250 (= Coomassie Brilliant Blue, Serva, Heidelberg, BRD), durch die eine Umwandlung der roten in die blaue Form vollzogen wird.

Durchführung: 0,025ml der Proteinlösung (Urin) wurden mit 1,25ml Reagenzlösung gemischt. Nach 5min erfolgte die Messung am Spektrometer (Spekol 1100, Zeiss, Jena, BRD) bei 595nm und 465nm in einer 0,5cm Glasküvette gegen Aqua dest. als Leerwert. Zur Auswertung wurde der Quotient aus der Extinktion bei 595nm und 465nm gebildet und aus der Eichkurve die Proteinkonzentration in mg/ml abgelesen.

Die Eichwerte wurden durch Verdünnungen der Stammlösung (0,1%-ige wäßrige Rinderserumalbuminlösung; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, BRD) im Bereich von 0,1 bis 1,0mg/ml hergestellt.

Aus der Proteinkonzentration im Urin errechnet sich die im Urin ausgeschiedene Proteinmenge bezogen auf das Körpergewicht der Ratten pro Stunde (Formel 2, siehe Kap. 4.5).

4.4.5 Bestimmung von Hydroxyprolin im Nierengewebe

Zunächst wurden 50-100mg Nierengewebe für mindestens 12 Stunden bei 97°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, zermörsert und mit Ethanol homogenisiert. Die Proben wurden für weitere 12 Stunden bei 4°C gekühlt, daraufhin wurde der Alkohol abgedampft. Nach Zugabe von 1ml 6M HCl wurde das Gewebe zur Hydrolyse 18 Stunden bei 105°C inkubiert (Julabo sw-21c Inkubator, Julabo Labortechnik, Seelbach, BRD).

Vorbereitung der Proben zur Messung der OH-Prolin-Konzentration mittels HPLC:

Nach Neutralisation von 800µl säurehydrolysierter Probe mit 800µl 6M NaOH, Filtration durch einen Millipore Filter mit 0,45µm und Verdünnung der Probe mit 0,1M K-Boratpuffer pH=9,5 (10µl Probe + 990µl Puffer) wurde die Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) (Fluka Chemie, Taufkirchen, BRD) und 4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan (NBD-Cl) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Taufkirchen, BRD) durchgeführt: 50µl der Probe wurden mit 25µl OPA und 25µl NBD-Cl 5min im 60°C beheizten Rack in 100µl Probeneinsätzen derivatisiert. Die Derivatisierungsreagentien bestanden aus 20mg OPA in 20ml 0,1M Natriumboratlösung pH=9,5 (7,5µmol/ml) und aus 20mg NBD-Cl in 20ml Methanol gelöst (5µmol/l). Diese Reagentien sind lichtgeschützt eine Woche haltbar.

Wie von RIEDEL et al. (1989) beschrieben reagiert OPA nur mit primären Aminen und Aminosäuren, d.h. Prolin und OH-Prolin werden nicht erfaßt. Nach PALMERINI et al. (1985) entstehen nach Umsetzung aller primären Aminosäuren mit OPA ohne Zusatz von Reduktionsmittel (Mercaptoethanol) nicht fluoreszierende Derivate. Setzt man nun Prolin und OH-Prolin mit NBD-Cl um, erhält man fluoreszierende Derivate, die man durch Herstellung oben genannter nicht fluoreszierender Derivate getrennt von allen anderen Aminosäuren bestimmen kann.

Nach der Derivatisierung erfolgte die HPLC (STRATFORD et al. 1990) mit Fluoreszenzdetektion (Fluoreszenzspektrometer RF-551, Shimadzu, Duisburg, BRD). Es wurden 20µl Probe auf eine Trennsäule des Typs C18 (ODS) gegeben (AS-1555 intelligent sampler, Jasco, Groß-Umstadt, BRD). Diese war 250 x 4mm groß und hatte eine Korngröße

von 5µm. Der Flow lag bei 1ml/min. Als Laufmittel wurde Natriumacetat-3-hydrat verwendet. Die Pufferlösung A bestand aus 1,56 l Lösung (14,1g Natriumacetat-3-hydrat in 2,06 l Aqua dest., mit 10%-iger Essigsäure auf einen pH von 7,0 eingestellt), die mit Methanol auf 2 l aufgefüllt wurde. Zur Pufferlösung B wurden 0,5 l Lösung (s.o.) auf 2 l mit Methanol aufgefüllt. Der Gradient der beiden Pufferlösungen während der 16-minütigen Laufzeit war wie folgt:

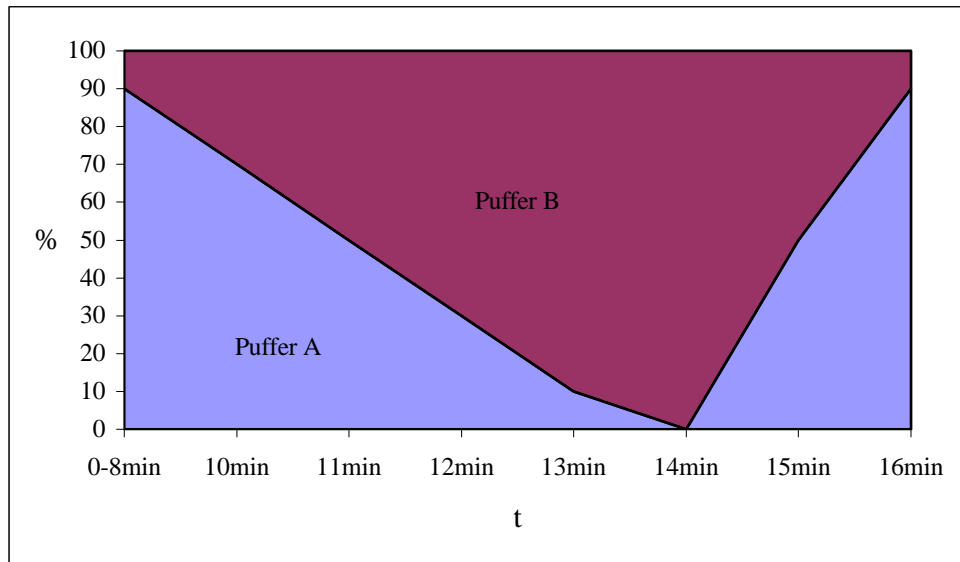


Abb.1:
Verlauf des Puffergradienten zur Analytik von OH-Prolin

Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 470nm und einer Emissionswellenlänge von 530nm. Die Chromatogramme wurden mit dem Rechnerprogramm JASCO-BORWIN Version 1.50 erstellt und ausgewertet. Die in diesen Versuchen verwendeten Substanzen stammten von SIGMA, Deisenhofen, BRD.

OH-Prolin wurde auf 1g TG der Niere bezogen.

4.4.6 Morphologie

Die Tiere wurden in Ethernarkose getötet, die linke Niere entnommen und in 5%-igem gepuffertem Formaldehyd (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) fixiert. Im Anschluß daran wurden von der Niere je zwei 3mm dicke Scheiben aus der Mitte des Organs entnommen. Diese Organschnitte wurden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe über Methylbenzoat und Benzol bis zum Paraffin entwässert. Paraffin dringt bei 60°C vollständig in die Gewebespalten des Organs ein und verleiht ihm eine schneidbare Konsistenz. Nach Einbettung der Proben in Paraffinblöcke konnte von diesen mit Hilfe eines Mikrotoms

(Rotationsmikrotom HM 335 E, Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, BRD) 5µm dicke Schnitte abgetragen, auf Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet werden.

Die Präparate wurden mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Anschließend wurden sie in Aqua dest. gespült. Es erfolgten unterschiedliche Färbungen der Schnitte:

Mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) entsteht ein blau-rot gefärbter Schnitt: Die basophilen Bestandteile des Präparates (Zellkerne und basophiles Plasma) werden durch Hämatoxylin blau gefärbt. Eosin als saure Verbindung färbt Zytoplasma, Bindegewebsfasern und andere Zellbestandteile rot.

Für die HE-Färbung wurden die Präparate nach obengenannter Vorbehandlung für 20 Minuten in Mayer's Hämatoxylin (Sigma, St. Louis, USA) gefärbt, für 5 Minuten in Aqua dest. und für weitere 10 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Danach erfolgte die weitere Färbung 5 Minuten in alkoholischer Eosin-Y-Lösung (Sigma, St. Louis, USA). Hieran schlossen sich erneut Spülungen in Aqua dest., einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol an (siehe unten).

Bei der Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS) werden glykogenhaltige Bestandteile in den Zellen sichtbar gemacht. Mittels Oxidation von Polysacchariden durch Perjodsäure entstehen Aldehydgruppen. Diese erzeugen mit Schiff-Reagenz (fuchsin-schweflige Säure) eine Rotfärbung.

Bei dieser Färbung wurden die Schnitte nach obengenannter Vorbehandlung für 10 Minuten in 1%-ige Perjodsäure-Lösung (Sigma, St. Louis, USA) gegeben und danach für jeweils 5 Minuten zuerst in Leitungswasser, dann in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten in Schiff'schem Reagenz (Sigma, St. Louis, USA) inkubiert und wiederum für je 5 Minuten in Leitungs- und destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wurden die Präparate für 20 Minuten in Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt. Hieran schloß sich die weitere Behandlung wie unten beschrieben an.

Für die Pikrosiriusrot-Bindegewebsfärbung (SIR) wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und in Aqua dest. gespült. Diese Färbemethode dient zur Darstellung der Kollagenfasern, welche sich in Picrosiriusrot anfärben. Die Schnitte wurden für 1 Stunde in Pikrosiriusrot (0,1% direkt Rot 80 [Fluka, Buchs, Schweiz] in konzentrierter Picrinsäure-Lösung [Fluka, Buchs, Schweiz]) und anschließend für 2 Minuten in 0,01M HCl eingebracht. Nach jedem Färbeverfahren wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, in Xylol gesäubert und mit DePeX (Serva, Heidelberg, BRD) eingedeckt.

4.5 Berechnung und statistische Auswertung

Die Ergebnisse einer Versuchsgruppe von 3-7 Tieren sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, sind alle Volumen- und Mengenangaben auf 100g Körpergewicht bezogen worden.

- 1) Die Kreatininclearance errechnet sich als Produkt aus Kreatininkonzentration im Urin und Harnvolumen pro Minute, dividiert durch die Kreatininkonzentration im Serum:

$$Cl_{Krea} = \frac{C_{Krea(U)} \times V_{(U)}}{C_{Krea(S)}} \left[\frac{\text{ml}}{100\text{g KG} \times \text{min}} \right]$$

Cl_{Krea} = Kreatininclearance

$C_{Krea(U)}$ = Kreatininkonzentration im Urin in mol/l

$C_{Krea(S)}$ = Kreatininkonzentration im Serum in mol/l

$V_{(U)}$ = Harnvolumen in ml/(100g KG x min)

- 2) Die im Urin ausgeschiedene Proteinmenge wurde pro 100g Körpergewicht errechnet und auf 1 Stunde bezogen. Diese Proteinmenge errechnet sich aus dem Produkt der Proteinkonzentration und dem Harnvolumen pro Stunde:

$$M_{Prot(U)} = C_{Prot(U)} \times V_{(U)} \left[\frac{\text{mg}}{100\text{g KG} \times \text{h}} \right]$$

$M_{Prot(U)}$ = im Urin ausgeschiedene Proteinmenge

$C_{Prot(U)}$ = Proteinkonzentration im Urin in mg/ml

$V_{(U)}$ = Harnvolumen in ml/(100g KG x h)

Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt. Nach den Erfahrungen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der

Friedrich-Schiller-Universität Jena entstammen die Versuchstiere einer einheitlichen Grundgesamtheit, so daß auf den f-Test verzichtet und der t-Test durchgeführt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programmes SPSS 10.0.5 S für Windows. Die Erstellung der Diagramme wurde mit Hilfe des Programmes Excel 5.0 der Firma Microsoft® Inc., USA auf einem Computer vom Typ Pentium® III der Firma Hyrican Informationssysteme AG, BRD, vorgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluß einer temporären warmen Ischämie auf die Nierenfunktion

Die Letalität der drei Versuchsgruppen Ko Isch, Isch 20 und Isch 45 war je nach Schwere der Schädigung unterschiedlich. Alle Kontrolltiere überlebten die Schein-OP. Am Höchsten war die Letalität bei den Isch 45-Tieren: 66% (28 von 42 Tieren) starben bis eine Woche nach dem Eingriff, die meisten (25) am 3. postoperativen Tag. Dahingegen starben bei den Isch 20-Tieren 41% (10 von 24 Ratten), davon 7 am 6. postoperativen Tag.

5.1.1 Körpergewicht

Zu Versuchsbeginn waren die Kontrolltiere mit 154 ± 2 g Körpergewicht leichter als die Versuchstiere, die einer 20-minütigen (Isch 20) (180 ± 2 g) bzw. 45-minütigen (Isch 45) (161 ± 2 g) warmen Ischämie unterzogen wurden. Die Einteilung in die verschiedenen Gruppen erfolgte jedoch zufällig. Alle Tiere der drei Gruppen (Ko Isch, Isch 20 und Isch 45) wurden unilateral nephrektomiert, so daß die uNX den Vergleich der Entwicklung des Körpergewichtes nicht beeinflusste. Das durchschnittliche Gewicht 20 Wochen nach den Eingriffen lag zwischen 256 ± 4 g (Ko Isch) und 255 ± 5 g (Isch 20) bzw. 253 ± 10 g (Isch 45). Das entsprach einer relativen Gewichtszunahme von 66% bei den Kontrolltieren bzw. von 42% (Isch 20) und 57% (Isch 45) bei den Ratten nach einer temporären warmen Ischämie der Niere. Es ergaben sich nach einem Beobachtungszeitraum von 20 Wochen keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich einer 20- bzw. 45-minütigen Ischämie mit der Kontrollgruppe. Eine kurzzeitige warme Ischämie hat daher unter unseren Versuchsbedingungen nur geringen Einfluß auf die Entwicklung des Körpergewichtes der überlebenden Tiere (siehe Anhang, Tabellen 1-3).

5.1.2 Harnvolumen

Das Harnvolumen der einseitig nephrektomierten Kontrolltiere nahm zwischen der 12. und 20. Woche nach dem Eingriff ab. Eine 45-minütige warme Ischämie der Niere bewirkte nach 8 und 12 Wochen eine signifikante Erniedrigung des Harnvolumens im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 2). 8 Wochen nach Ischämie schieden die Tiere der Gruppe Isch 45 nur 38% des Harnvolumens der Kontrollgruppe aus. Im weiteren Verlauf, nach 16 und 20 Wochen, lag das Harnvolumen der Isch 45-Tiere und den Kontrollen im gleichen Bereich. Die Auswirkung auf das Harnvolumen ist abhängig von der Dauer der temporären warmen Ischämie. Eine 45-minütige warme Ischämie der Niere bewirkte verglichen mit einer 20-minütigen warmen Ischämie eine signifikante Reduktion des Harnvolumens 8 und 12 Wochen

nach dem Eingriff. Das ausgeschiedene Harnvolumen von Isch 20 entsprach über den gesamten Zeitraum von 20 Wochen annähernd dem der Kontrolltiere.

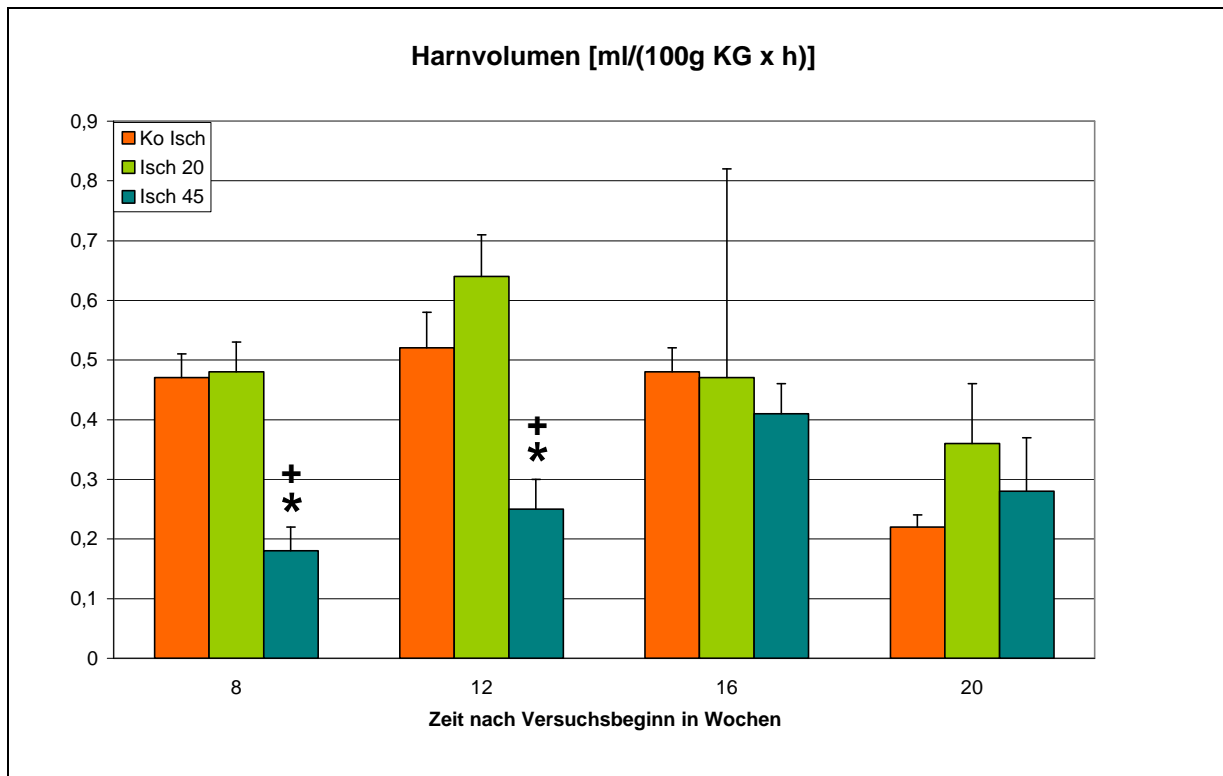


Abb. 2:

Einfluß einer 20- (Isch 20) bzw. 45- (Isch 45) minütigen Ischämie der Niere auf die Harnvolumina. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-7$; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko Isch), + = signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen Isch 20 und Isch 45 ($p \leq 0,05$).

5.1.3 Kreatininclearance

Die Kreatininclearance betrug bei einseitig nephrektomierten Kontrolltieren 8 Wochen nach Versuchsbeginn $0,45 \pm 0,06 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{min})$ (Abb. 3). Bei allen Ratten der drei Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe, wurde eine unilaterale Nephrektomie durchgeführt. Kontrollen mit zwei intakten Nieren (siehe Ko UN, 8. Woche, Kap. 5.3.3) erreichten eine durchschnittliche Kreatininclearance von $0,58 \pm 0,04 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{min})$. Das heißt, obwohl die Nierenmasse bei der Gruppe Ko Isch durch die uNX um 50% reduziert worden ist, war die GFR jedoch nur um 22% niedriger als bei Ratten mit zwei intakten Nieren. Die Kreatininclearance der Kontrolltiere mit einer intakten Niere nahm im Zeitraum von 8 bis 20 Wochen nach Ischämie ab. Die GFR der Gruppe Isch 45 normalisierte sich nach initialer, allerdings nicht signifikanter Reduktion und lag 16 Wochen nach Eingriff auf gleichem Niveau wie die Kontrollgruppe. Isch 20 und Isch 45 unterschieden sich nicht wesentlich

bezüglich der GFR. Lediglich in der 8. Woche war eine signifikante Reduktion der GFR bei der Gruppe Isch 20 gegenüber den Kontrolltieren nachweisbar, wogegen die GFR der Isch 45-Tiere zu diesem Zeitpunkt zwar auch erniedrigt, aber nicht signifikant verändert war. Betrachtet man die Auswirkungen der Ischämie im Zusammenhang, läßt sich feststellen, daß die unterschiedlichen Ischämiezeiten gleichartige Veränderungen der GFR nach sich zogen.

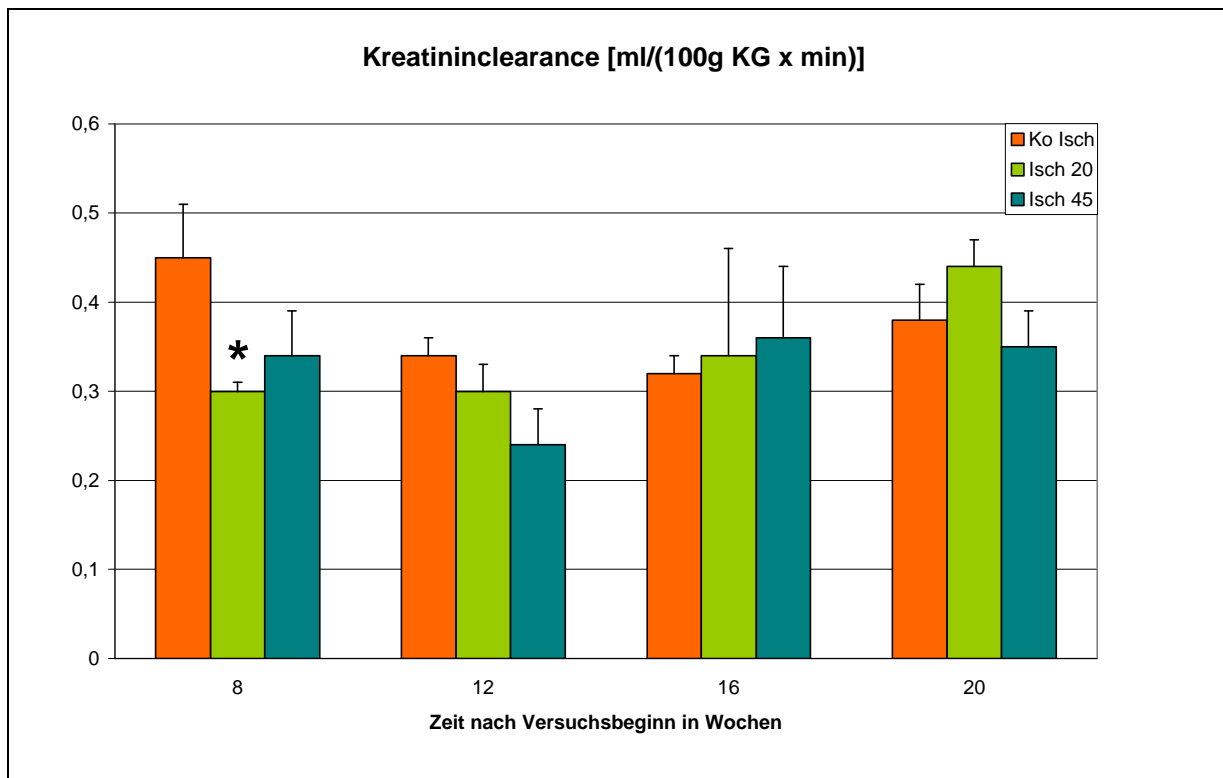


Abb. 3:

Verlauf der Kreatinin clearance 8-20 Wochen nach 20- (Isch 20) bzw. 45- (Isch 45) minütiger Ischämie der Niere. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-7$; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko Isch, $p \leq 0,05$).

5.1.4 Renale Proteinausscheidung

Zu einer geringfügigen Zunahme der Proteinurie kam es bei den Kontrollen im Zeitraum bis 20 Wochen nach Versuchsbeginn als Folge der unilateralen Nephrektomie. 8 Wochen nach uNX lag die renale Proteinausscheidung bei $0,12 \pm 0,03 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$, nach 20 Wochen bei $0,17 \pm 0,09 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$. Im Vergleich dazu wiesen Kontrollen mit zwei intakten Nieren (siehe Ko UN, Kap. 5.3.4) eine Proteinurie von $0,07 \pm 0,01 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$ in der 8. Woche bzw. von $0,10 \pm 0,01 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$ in der 20. Woche auf. Eine uNX bewirkte im Vergleich zu Kontrollen mit zwei intakten Nieren eine Zunahme der Proteinausscheidung um etwa 70%. Nach warmer Ischämie der Niere war sowohl bei der Gruppe Isch 20 als auch bei

der Gruppe Isch 45 die Proteinausscheidung während des gesamten Beobachtungszeitraumes nur leicht erhöht. Eine signifikante Zunahme der Proteinurie der Gruppe Isch 45 gegenüber den uNX-Kontrollen auf über das Doppelte wurde lediglich in der 20. Woche nach temporärer warmer Ischämie deutlich (Isch 45: $0,38 \pm 0,12 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$ und Ko Isch: $0,17 \pm 0,09 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$). Weitere wesentliche Auswirkungen auf die Proteinausscheidung im Harn durch die unterschiedliche Ischämiezeit von 20 bzw. 45 Minuten ließen sich nicht feststellen (siehe Anhang, Tabellen 1-3). Daher wurde auf eine detailliertere Befunddarstellung verzichtet.

5.1.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

Die Konzentration von OH-Prolin bezogen auf 1g Trockengewicht der Niere als Maß einer gesteigerten Kollagenkonzentration und somit als Marker fibrotischer Veränderungen nahm bei den einseitig nephrektomierten Kontrolltieren im Zeitraum von 8 bis 20 Wochen nach Eingriff um ca. 20% zu (Abb. 4).

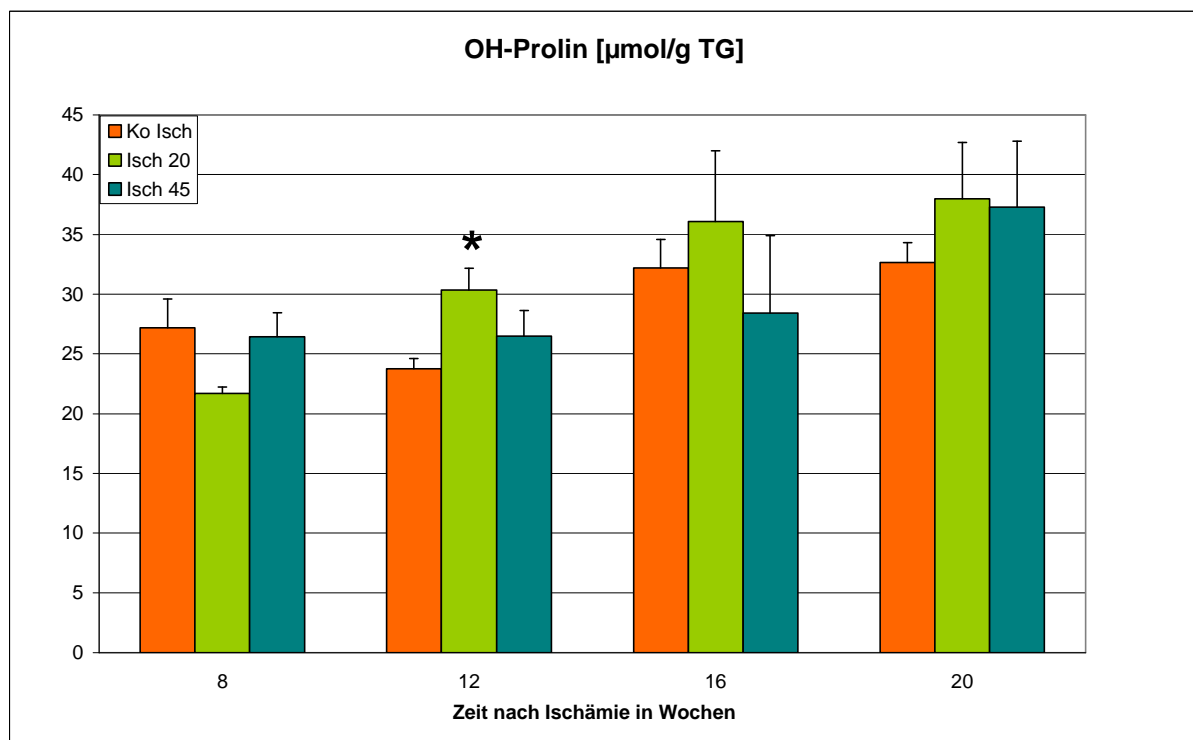


Abb. 4:

Einfluß einer 20- (Isch 20) bzw. 45- (Isch 45) minütigen Ischämie der Niere auf die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko Isch, $p \leq 0,05$). Bei Isch 20 konnte in der 8. Woche nur für ein Tier die OH-Prolinkonzentration gemessen werden.

Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Ratten nach warmer Ischämie von 45 Minuten ergaben sich keine Unterschiede. Die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Gruppe Isch 45 stieg im Beobachtungszeitraum ebenso an, wie bei der Gruppe Isch 20. Lediglich in der 12. Woche nach Ischämie war die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe von Isch 20 gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Der Kontrollwert war zu diesem Zeitpunkt jedoch relativ niedrig bestimmt worden. Allerdings fällt auf, daß im weiteren Beobachtungszeitraum bis zur 20. Woche die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Kontrollgruppe tendenziell niedriger war, als bei der Gruppe Isch 20. Bei der Gruppe Isch 45 war dieser Effekt nur andeutungsweise zu erkennen (12. und 20. Woche).

5.1.6 Morphologie

Die Nieren der Ratten nach 20- bzw. 45-minütiger Ischämie wurden 20 Wochen nach dem Eingriff morphologisch untersucht. Ko UN-Tiere (siehe 5.3.6) mit zwei intakten Nieren wurden als Kontrollgruppe herangezogen. Abbildung 5 zeigt zunächst ein histologisches Bild einer Niere von Kontrolltieren mit zwei intakten Nieren ohne pathologische Veränderungen (PAS-Färbung zur Darstellung glykogenhaltiger Bestandteile). Eine histologische Untersuchung von Nieren der Gruppe Ko Isch nach uNX wurde nicht durchgeführt. Makroskopisch zeigten sich keine Unterschiede beim Vergleich von Nieren der Gruppe Ko Isch nach uNX mit Nieren der Gruppe Ko UN, bei der beide Nieren in situ belassen wurden.

Abbildung 6 zeigt einen Nierenschnitt 20 Wochen nach einer warmen Ischämie von 45 Minuten Dauer. Nach Ischämie fanden sich, bei insgesamt nur blande ausgeprägten Veränderungen, einzelne atrophische Tubuli und eine geringfügig verdickte tubuläre Basalmembran, aber keine interstitielle Nierenfibrose. Eine histologische Untersuchung von Nieren der Isch 20-Tiere wurde nicht durchgeführt, da sich makroskopisch keine Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe erkennen ließen und sogar bei der länger andauernden Ischämie von 45 Minuten Dauer kaum Veränderungen histologisch nachweisbar waren (siehe oben).

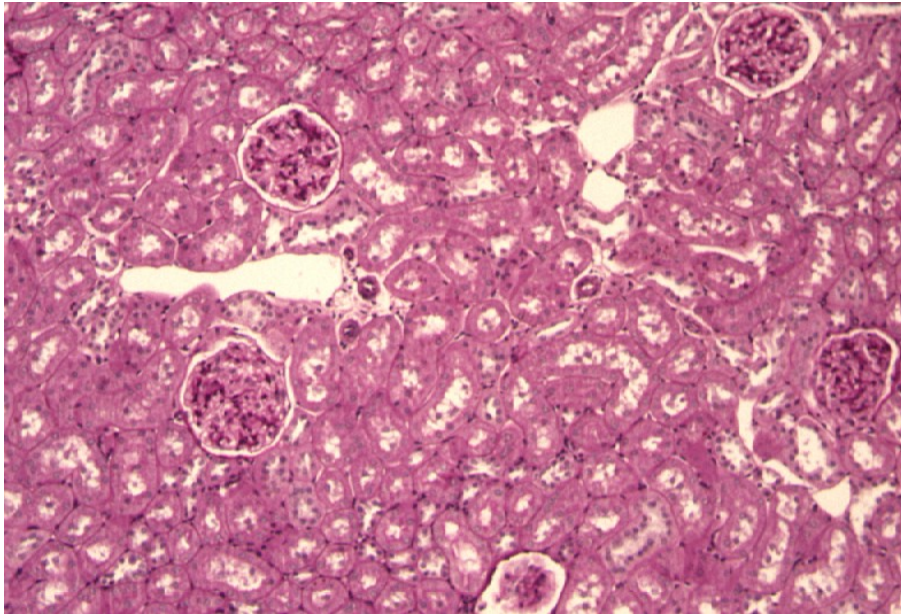


Abb. 5:
Nierenschnitt eines Kontrolltieres (Ko UN) ohne pathologische Veränderungen (PAS-Färbung, Vergrößerung 200-fach).

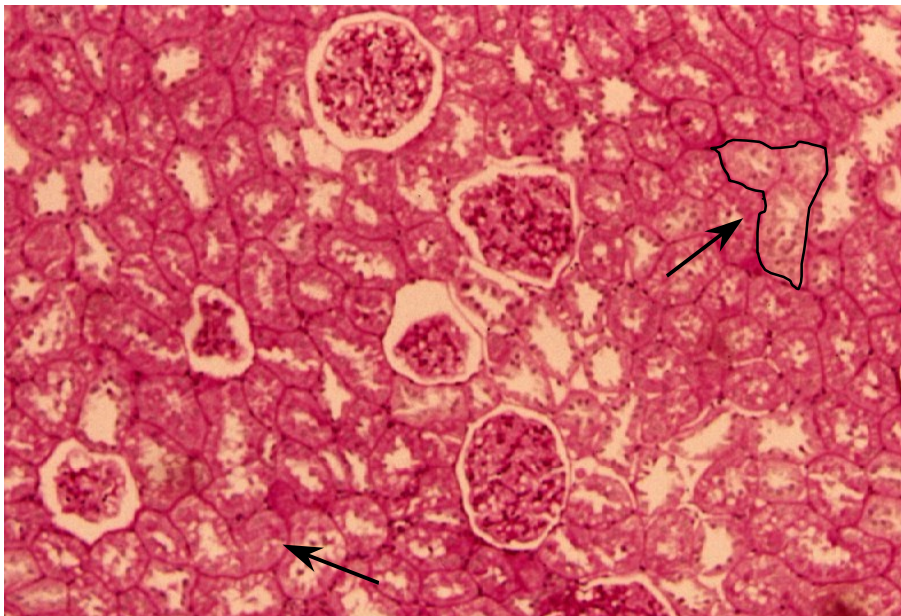


Abb. 6:
Histologie einer Niere 20 Wochen nach 45-minütiger warmer Ischämie. Es sind einzelne atrophische Tubuli (Pfeile) nachzuweisen (PAS-Färbung, Vergrößerung 250-fach).

5.2 Einfluß einer 5/6 NX auf die Nierenfunktion

Von 30 5/6 NX-Tieren und 24 scheinoperierten Kontrolltieren starben keine Ratten an den Folgen der Eingriffs.

5.2.1 Körpergewicht

Zum Zeitpunkt der 5/6 NX betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Kontrolltiere $168 \pm 3\text{g}$ (Abb. 7). Nach einem Beobachtungszeitraum von 20 Wochen waren die Kontrollen mit zwei Nieren $284 \pm 12\text{g}$ schwer. Das entspricht einer Gewichtszunahme von 69%. Die 5/6 nephrektomierten Tiere mit einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von $161 \pm 2\text{g}$ zeigten nach einer Woche eine Abnahme des Körpergewichts von 4%. Im weiteren Verlauf bis 20 Wochen nach 5/6 NX kam es zu einer Gewichtszunahme um 58% auf $255 \pm 5\text{g}$. Die Versuchstiere blieben im gesamten Versuchszeitraum leichter als die Kontrollgruppe, wobei der Unterschied des absoluten Körpergewichtes mit fortschreitender Zeit deutlicher wurde. Eine Signifikanz ergab sich in den Wochen 8, 10 und 20 nach 5/6 NX. 20 Wochen nach dem Eingriff waren die 5/6 NX-Ratten um ca. 10% leichter als die Kontrolltiere.

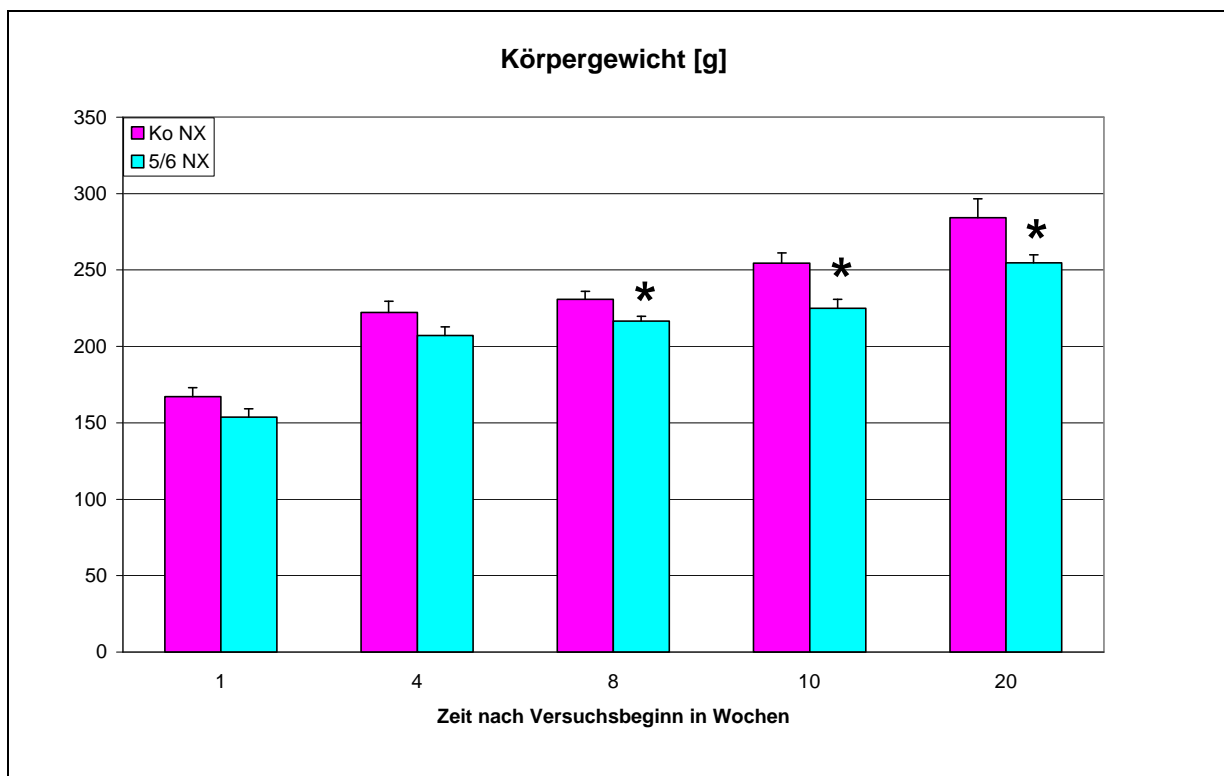


Abb.7:

Entwicklung des Körpergewichtes bei Ratten nach 5/6 NX. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko NX, $p \leq 0,05$).

5.2.2 Harnvolumen

Überraschenderweise hatte die 5/6 NX während der gesamten Beobachtungsperiode (1.-20. Woche) keinen signifikanten Einfluß auf das Harnvolumen (Befunde siehe Anhang, Tabellen 4 und 5). Bis zur 4. Woche nach dem Eingriff lagen die Harnvolumina bei Kontroll- und 5/6 NX-Tieren in einem Bereich von $0,46 \pm 0,07$ bis $0,79 \pm 0,12 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$. Ab der 8. Woche schieden sowohl Kontroll-, als auch 5/6 NX-Tiere nur noch $0,27 \pm 0,13$ bis $0,43 \pm 0,08 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$ aus. Die Abnahme des Harnvolumens zwischen der 4. und 8. Woche war sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der Gruppe 5/6 NX zu verzeichnen.

5.2.3 Kreatininclearance

In Abbildung 8 ist die Kreatininclearance von Kontrolltieren und Ratten nach 5/6 NX wiedergegeben. Die Kontrollen zeigten im Versuchszeitraum bis 20 Wochen nach Schein-OP einen Rückgang der GFR (FLECK 1999).

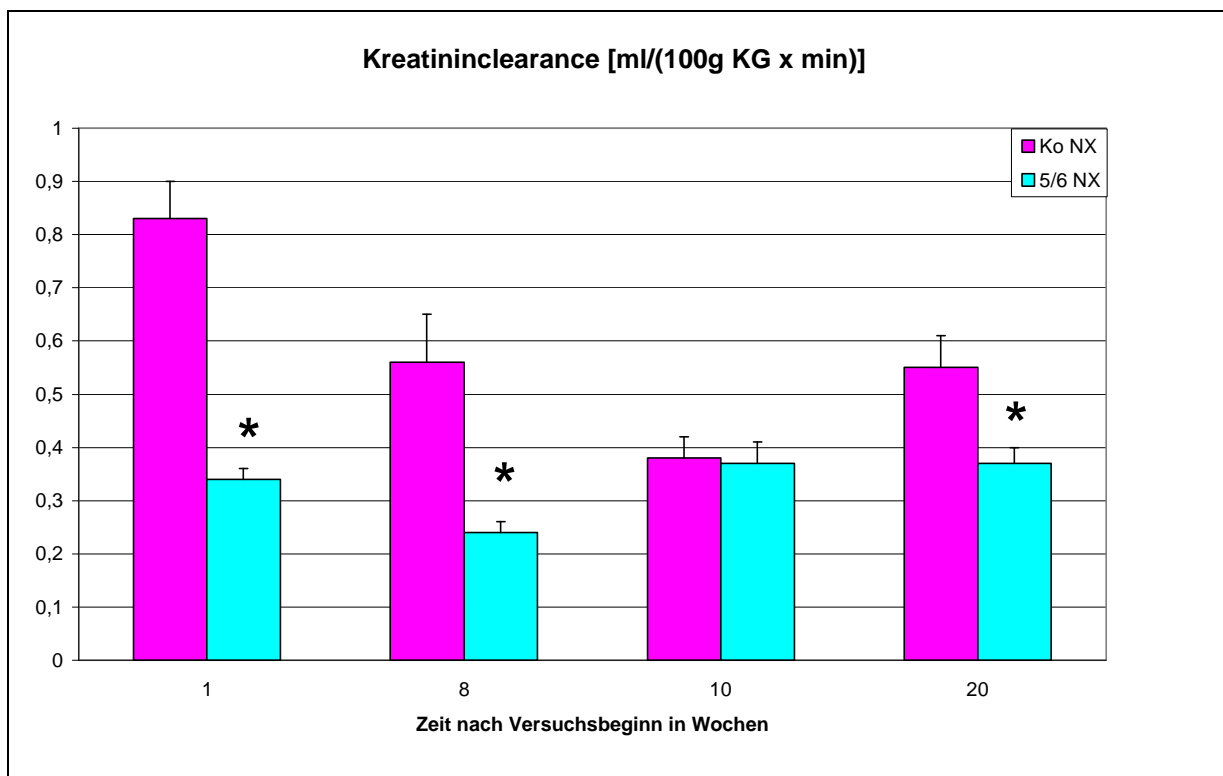


Abb. 8:

Verlauf der Kreatininclearance 1-20 Wochen nach 5/6 NX. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko NX, $p \leq 0,05$).

Trotz Reduktion des Nierengewebes um 83% erreichte die GFR bei 5/6 nephrektomierten Tieren eine Woche nach Eingriff bereits 41% der Kreatininclearance der Kontrollen, in der 8. Woche waren es 43% und in der 20. Woche 67%. Es kam somit zu einer deutlichen

Kompensation der Filtrationsleistung nach 5/6 NX. Die Reduktion der GFR nach 5/6 NX war bis zur 20. Woche signifikant, wobei im Verlauf des Versuches eine Annäherung der GFR der Kontrollen und der 5/6 NX-Gruppe nachweisbar war. Das heißt, die Kreatininclearance der 5/6 NX-Gruppe stieg im Beobachtungszeitraum bis zur 20. Wochen relativ zur Kontrollgruppe an. Das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen Ko NX und 5/6 NX in der 10. Woche ist nicht überzubewerten, da zu diesem Zeitpunkt der Wert der Kontrolltiere relativ niedrig bestimmt war.

5.2.4 Renale Proteinausscheidung

Die renale Proteinausscheidung bei Kontrolltieren blieb im Zeitraum bis 20 Wochen nach Schein-OP konstant auf niedrigem Niveau (durchschnittlich $0,08 \pm 0,01 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$). Demgegenüber fällt die progrediente Proteinurie (Abb. 9) bei 5/6 nephrektomierten Tieren auf.

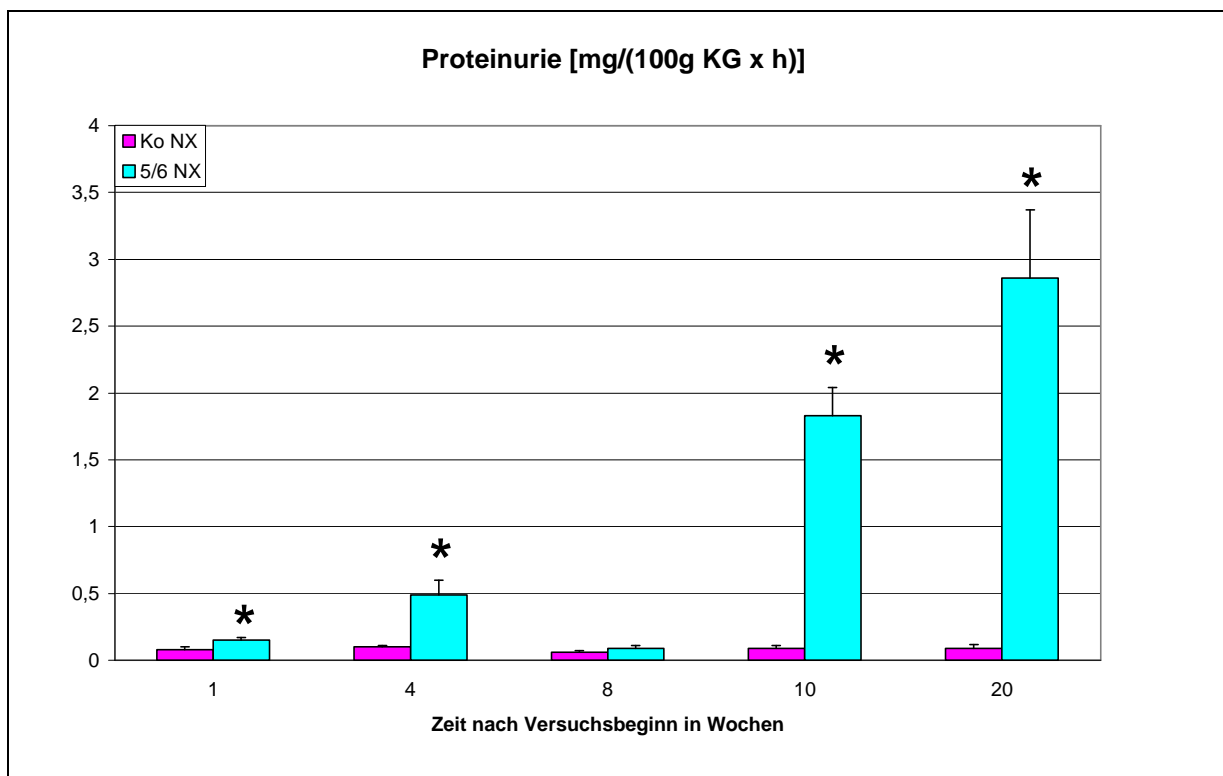


Abb. 9:

Einfluß der 5/6 NX auf die renale Proteinausscheidung. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko NX, $p \leq 0,05$).

Bereits eine Woche nach 5/6 NX war die Proteinausscheidung im Urin signifikant auf fast das Doppelte im Vergleich zu Kontrolltieren gesteigert. 4, 10 und 20 Wochen nach 5/6 NX fanden sich weitere signifikante Unterschiede. Ein Grund für den relativ niedrig bestimmten

Wert der Gruppe 5/6 NX in der 8. Woche konnte nicht gefunden werden. Die renale Proteinausscheidung betrug in der 20. Woche bei Kontrolltieren $0,09 \pm 0,03\text{mg}/(100\text{g KG} \times \text{h})$, im Vergleich zu Ratten nach 5/6 NX mit $2,86 \pm 0,51\text{mg}/(100\text{g KG} \times \text{h})$.

5.2.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

Kontrolltiere mit zwei intakten Nieren zeigten im Zeitraum bis 20 Wochen nach Schein-OP eine geringfügige Steigerung der Konzentration an OH-Prolin (Abb. 10). Dieser Anstieg deutete sich auch bei den unilateral nephrektomierten Kontrolltieren im Ischämieversuch an, wobei die durchschnittliche OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Gruppe Ko Isch nach uNX tendenziell, aber nicht signifikant, höher lag.

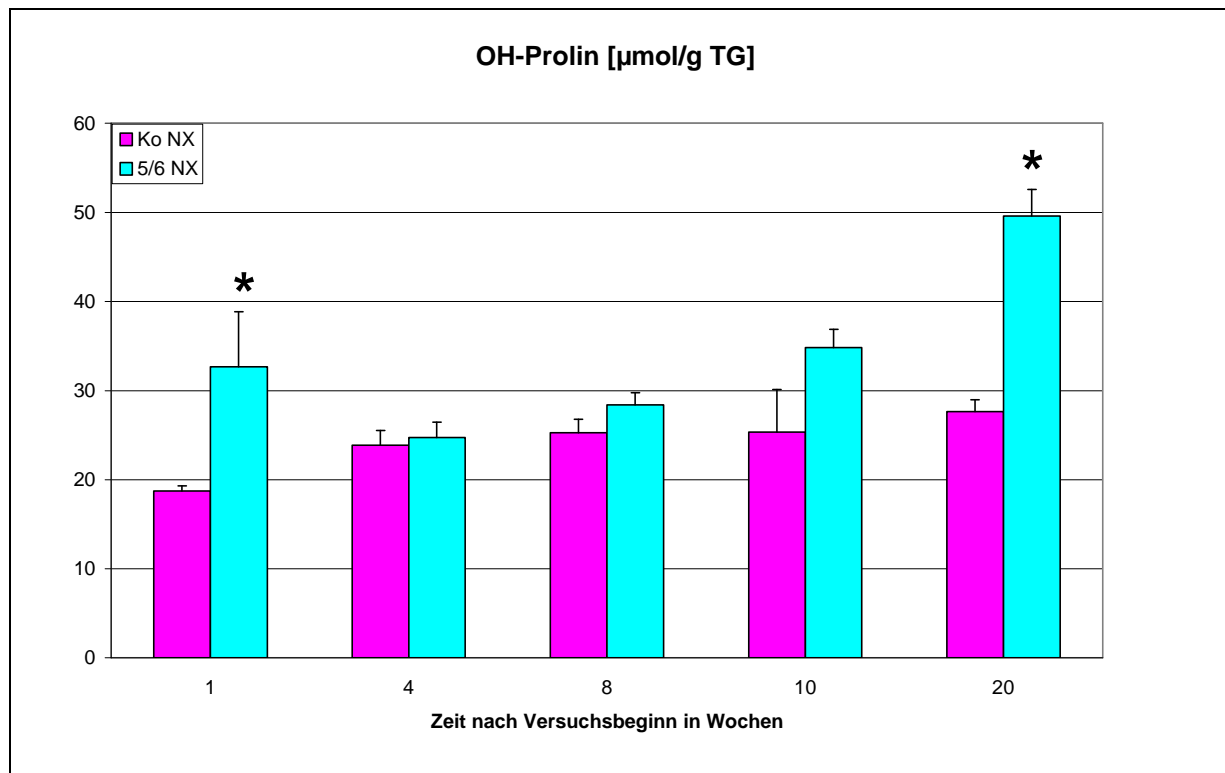


Abb. 10:

Einfluß der 5/6 NX auf die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-6$; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko NX, $p \leq 0,05$).

Eine Woche nach 5/6 NX wiesen die Tiere eine um 74% signifikant erhöhte OH-Prolin-Konzentration auf. Da sich der Wert jedoch in der 4. Woche nach 5/6 NX wieder normalisierte und zwischen Kontrollen und Versuchstieren kein Unterschied mehr bestand, ist in der 1. Woche nach dem Eingriff von einer akuten Schädigung auszugehen. Im Zeitraum 8 bis 20 Wochen nach 5/6 NX stieg die Konzentration an OH-Prolin im Nierengewebe bei den 5/6 NX-Tieren wieder zunehmend an, so daß sich 20 Wochen nach 5/6 NX erneut ein

signifikanter Unterschied ergab. Die OH-Prolinkonzentration war um 79% im Vergleich zu Kontrollen erhöht. Dies entspricht der Bildung von Narbengewebe im OP-Bereich (siehe Abb. 11).

5.2.6 Morphologie

Eine morphologische Untersuchung des Nierengewebes erfolgte 1, 10 und 20 Wochen nach 5/6 NX. Es fanden sich in Gruppen angeordnete dilatierte Tubuli mit Proteinzyclindern. Des weiteren hatten sich tröpfchenförmige hyaline Proteine in den tubulären Epithelien angereichert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der massiven Erhöhung der Proteinausscheidung im Harn, die bei den nephrektomierten Tieren gemessen werden konnte (vgl. Abb. 9). Wie in Abbildung 10 zu sehen, läßt sich die hohe Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe in der 20. Woche nach Versuchsbeginn (vgl. auch Abb. 11) unter anderem durch die stark bindegewebig umgewandelte Nierenkapsel erklären. Die zugehörigen Kontrollen sind in Abbildung 5 dargestellt.

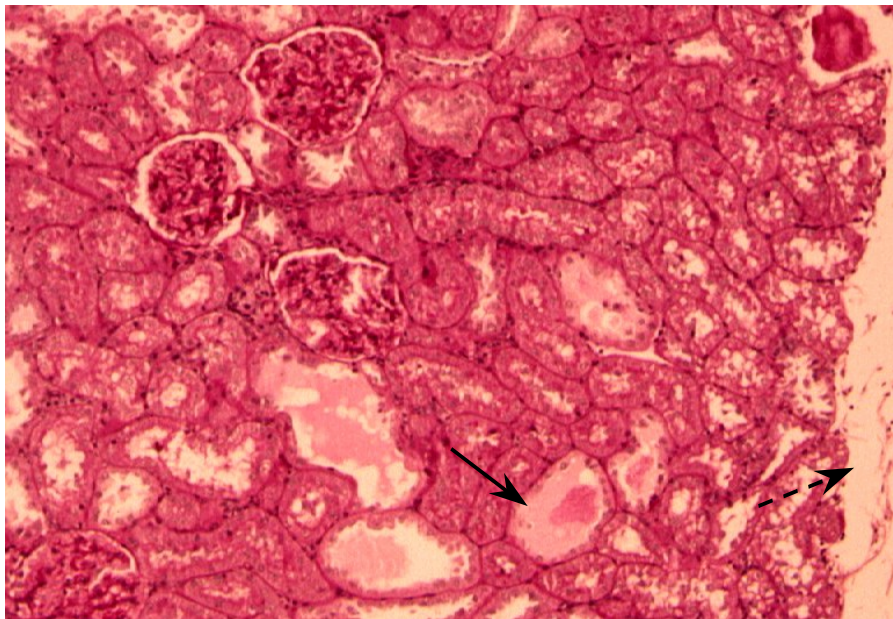


Abb. 11:

Histologisches Nierenpräparat 20 Wochen nach 5/6 NX. Dilatierte Tubuli, in denen Proteinzyclinder nachzuweisen sind (Pfeil, durchgehend) und kollagenreiches Narbengewebe (Pfeil, gestrichelt) sind zu erkennen (PAS-Färbung, Vergrößerung 250-fach).

5.3 Einfluß einer einmaligen Gabe von Uranylnitrat auf die Nierenfunktion

Die Letalität bei den Gruppen Ko UN, UN 0,3 und UN 0,5 war, analog zu den Ischämie-Versuchen, entsprechend der Schwere der Schädigung unterschiedlich. Bis zum 6. Tag nach UN-Applikation starben 11% (2 von 19) der UN 0,3-Tiere sowie 19% (6 von 31) der UN 0,5-Tiere. Die Kontrolltiere überlebten alle.

5.3.1 Körpergewicht

Zu Versuchsbeginn wogen die Kontrolltiere durchschnittlich $169 \pm 3\text{g}$, die Gruppe UN 0,3 war durchschnittlich $164 \pm 6\text{g}$, die Gruppe UN 0,5 $165 \pm 2\text{g}$ schwer. Bei Kontrolltieren sowie nach einmaliger Applikation von Uranylnitrat in Dosierungen von 0,3 bzw. 0,5mg/100g KG kam es im Zeitraum 2 bis 20 Wochen nach UN-Gabe zu einer kontinuierlichen Zunahme des Körpergewichts. Am Ende des Beobachtungszeitraums nach 20 Wochen waren die Kontrolltiere durchschnittlich $252 \pm 4\text{g}$, die Tiere der Gruppe UN 0,3 $271 \pm 11\text{g}$ und die Tiere der Gruppe UN 0,5 $255 \pm 7\text{g}$ schwer. Dies entspricht einer Gewichtszunahme von 49% bei den Kontrolltieren, von 65% bei Tieren der Gruppe UN 0,3 und von 54% bei Tieren der Gruppe UN 0,5. Es ergaben sich keine Signifikanzen, weder im Vergleich der Kontrollgruppe mit UN 0,3-Tieren bzw. UN 0,5-Tieren, noch zwischen den Versuchstieren mit unterschiedlicher UN-Dosis. Eine einmalige Applikation von 0,3 bzw. 0,5mg UN wirkte sich somit nicht wesentlich auf die Entwicklung des Körpergewichts der Ratten aus (siehe Anhang, Tabellen 6-8).

5.3.2 Harnvolumen

Im Zeitraum von 2 bis 20 Wochen nach NaCl-Applikation (Ko UN) nahm das Harnvolumen der Kontrolltiere ab (siehe Anhang, Tabelle 6). Dies bestätigten die Befunde, die bei den Kontrolltieren der Gruppe 5/6 NX erhoben wurden (siehe Kap. 5.2.2). Demgegenüber stand die signifikante Reduktion des Harnvolumens der Ratten nach einmaliger Gabe von 0,5mg UN/100g KG ab der 8. Woche nach UN-Gabe. Dabei schieden die Tiere 8 Wochen nach UN-Applikation im Durchschnitt nur 39% und nach 20 Wochen nur 33% des Harnvolumens der Kontrollen aus. In der 20. Woche unterschieden sich die Dosierungen UN 0,3 und UN 0,5 in Bezug auf das Harnvolumen noch deutlicher: UN 0,3: $0,16 \pm 0,01\text{ml}/(100\text{g KG} \times \text{h})$; UN 0,5: $0,08 \pm 0,01\text{ml}/(100\text{g KG} \times \text{h})$. Sogar die Tiere der Gruppe UN 0,3 schieden 20 Wochen nach UN-Gabe nur noch 67% des Harnvolumens der Kontrollgruppe aus (Ko UN: $0,24 \pm 0,04\text{ml}/(100\text{g KG} \times \text{h})$). Detaillierte Angaben sind dem Anhang (Tabellen 6-8) zu entnehmen.

5.3.3 Kreatininclearance

Die GFR der UN-Kontrolltiere war im Vergleich zu den Ischämie-Kontrollen höher, da die Ratten der Gruppe Ko UN zwei intakte Nieren hatten, wohingegen die Tiere der Gruppe Ko Isch unilateral nephrektomiert wurden (20. Woche signifikanter Unterschied: Ko Isch: $0,38 \pm 0,04 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{min})$; Ko UN: $0,57 \pm 0,03 \text{ ml}/(100 \text{ g KG} \times \text{min})$, siehe Kap. 5.1.3). Eine geringfügige Abnahme der Kreatininclearance im Zeitraum der 2. bis 20. Woche deutete sich auch bei UN-Kontrolltieren an (Abb. 12), wie bereits für die Gruppen Ko Isch und Ko NX gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3 und 8).

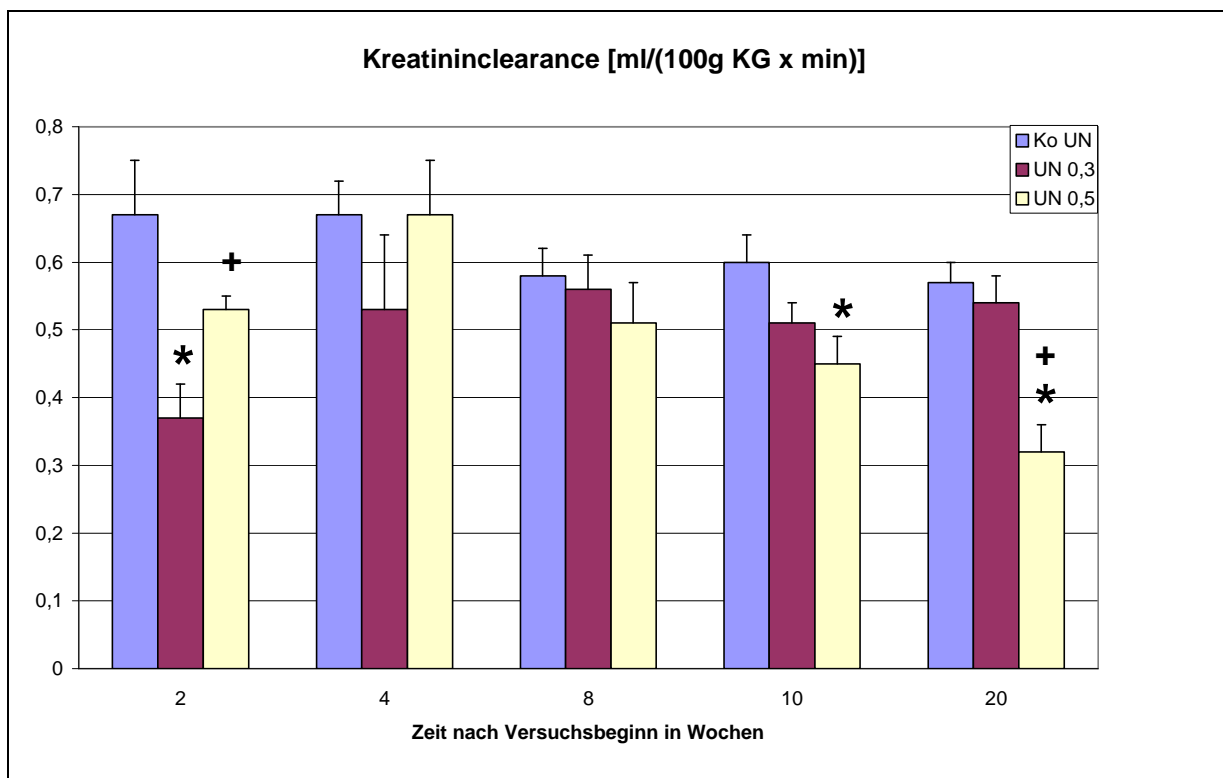


Abb. 12:

Verlauf der Kreatininclearance 2-20 Wochen nach einmaliger i.p. Injektion von UN (0,3 bzw. 0,5mg/100g KG). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,3 und UN 0,5 ($p \leq 0,05$).

Im Vergleich dazu fällt die signifikante Abnahme der GFR bei der Gruppe UN 0,5 gegenüber der Gruppe Ko UN auf, die in der 10. Woche 25% und in der 20. Woche 44% betrug. Eine Schädigung durch einmalige Applikation von 0,5mg UN/100g KG kann man demnach besonders deutlich in der Endphase des Beobachtungszeitraums feststellen. Die Gabe der niedrigeren Dosis von 0,3mg UN/100g KG bewirkte außer einer akuten signifikanten Reduktion der Kreatininclearance nach 2 Wochen keine Unterschiede. Die GFR von UN 0,3 lag im weiteren Verlauf durchschnittlich auf dem Niveau der Kontrollgruppe. 10 und 20

Wochen nach UN-Gabe war der UN-Effekt demnach abhängig von der applizierten Dosis. Obwohl in den ersten Wochen kein Unterschied zwischen der UN 0,5- und der Kontrollgruppe festzustellen war, ist insgesamt bei einer signifikant verminderten Kreatininclearance der UN 0,5-Tiere im Vergleich zu den Kontrollratten in der 10. und 20. Versuchswoche von einer schwereren Nierenschädigung durch die höhere Dosis UN auszugehen.

5.3.4 Renale Proteinausscheidung

Die renale Proteinausscheidung war bei Kontrolltieren mit zwei intakten Nieren im Zeitraum 2 bis 20 Wochen nach einmaliger NaCl-Applikation konstant niedrig und lag immer unter 0,1mg/(100g KG x h) (Abb. 13).

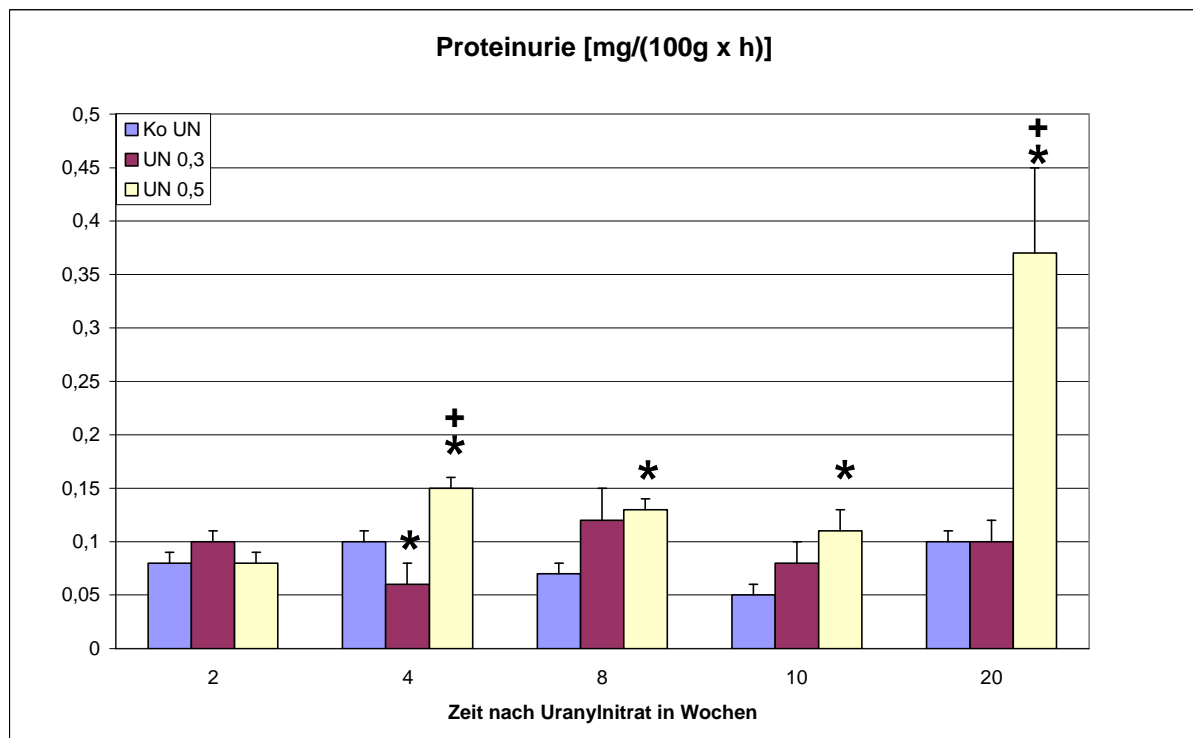


Abb. 13:

Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von UN (0,3 bzw. 0,5mg/100g KG) auf die renale Proteinausscheidung. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,3 und UN 0,5 ($p \leq 0,05$).

2 Wochen nach einer einmaligen Gabe von 0,5mg UN/100g KG waren noch keine Unterschiede im Vergleich mit den Gruppen Ko UN und UN 0,3 in Bezug auf die Proteinurie zu finden. Dagegen bewirkte UN 0,5 eine signifikante Steigerung der renalen Proteinausscheidung im Zeitraum 4 bis 20 Wochen nach einmaliger UN-Gabe und erreichte

in der 20. Woche einen fast 4-fach höheren Wert, als die Kontrolltiere und UN 0,3. Der Vergleich von UN 0,3 und UN 0,5 zeigt die Dosisabhängigkeit bei einmaliger Gabe von UN in Bezug auf die renale Proteinausscheidung. Eine einmalige Dosis von 0,3mg UN/100g KG bewirkte im Versuchszeitraum von 20 Wochen nach Applikation keine Zunahme der Proteinurie. Signifikant erhöht war die Proteinausscheidung von UN 0,5 gegenüber UN 0,3 in der 4. und 20. Woche nach UN-Gabe. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die Proteinurie der Tiere der Gruppe UN 0,5 nur minimal gesteigert war im Vergleich mit der Gruppe 5/6 NX (siehe Abb. 9). So war die renale Proteinausscheidung in der 20. Woche bei den 5/6 nephrektomierten Tieren ca. 8-fach höher als bei den Tieren der Gruppe UN 0,5.

5.3.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

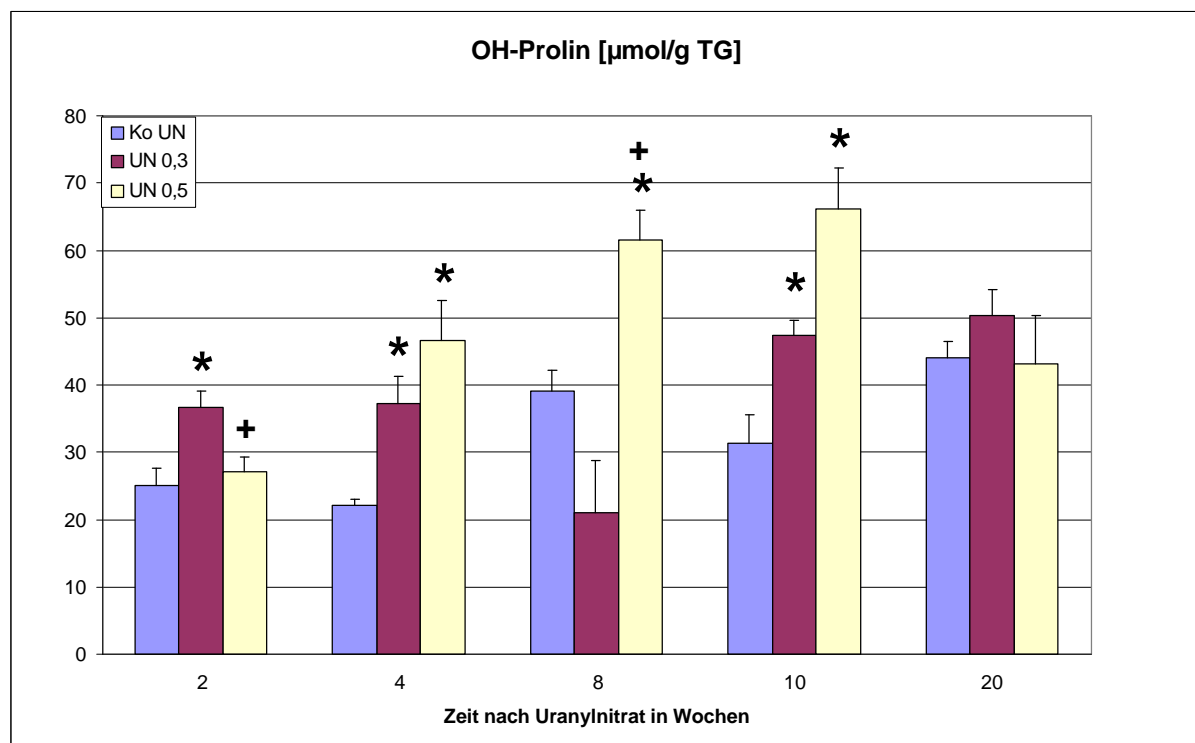


Abb. 14:

Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von UN (0,3 bzw. 0,5mg/100g KG) auf die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,3 und UN 0,5 ($p \leq 0,05$). Bei der Gruppe UN 0,3 konnten in der 20. Woche nur 2 Werte ermittelt werden.

Analog zu den Kontrolltieren in den Ischämie- und Nephrektomieversuchen (siehe Abb. 4 und 10), nahm die Konzentration an OH-Prolin bezogen auf 1g Trockengewicht der Niere auch bei der Gruppe Ko UN im Zeitraum 2 bis 20 Wochen nach Versuchsbeginn geringfügig zu (Abb. 14). Dahingegen wies die Gruppe UN 0,5 in diesem Zeitraum eine wesentlich stärkere

Zunahme der renalen OH-Prolin-Konzentration auf, die im Vergleich zur Kontrollgruppe 4, 8 und 10 Wochen nach einmaliger Gabe von 0,5mg UN/100g KG signifikant war. Dabei lag der Wert in der 4. und 10. Woche um das 2,1-fache höher, in der 8. Woche um das 1,6-fache. Der Verlauf der OH-Prolin-Konzentration im Nierengewebe nach UN 0,5 ergab in der 2. und 20. Woche relativ niedrige Werte. UN 0,3 führte 2, 4 und 10 Wochen nach UN-Applikation ebenfalls zu einer signifikant erhöhten OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Prinzipiell nahm mit höherer Dosis UN die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe bei Ratten im Beobachtungszeitraum bis zur 10. Woche deutlicher zu.

5.3.6 Morphologie

Im makroskopischen Vergleich der Nieren von Ko UN, UN 0,3 und UN 0,5 waren bereits 4 Wochen nach einmaliger UN-Applikation deutliche Unterschiede zu sehen. Die Niere (Abb. 15) der Gruppe UN 0,5 zeigte eine höckrige Oberfläche und war im Vergleich zur Niere der Kontrollgruppe deutlich vergrößert und aufgehellte. Diese wies eine glatte spiegelnde Oberfläche von dunkelroter Farbe auf. Die Veränderungen der Niere nach Applikation der niedrigeren Dosis von 0,3mg UN/100g KG waren weniger stark ausgeprägt, als nach 0,5mg UN/100g KG, wiesen aber ähnliche Schädigungszeichen wie nach UN 0,5 auf.

Abbildung 16 zeigt den makroskopischen Aspekt einer Niere der Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Niere von UN 0,5 nach 20 Wochen Versuchsdauer. Es fällt auf, daß nunmehr die Niere der Versuchstiergruppe UN 0,5 deutlich kleiner erscheint als die der Kontrollgruppe. Des weiteren erkennt man bei der Niere nach UN 0,5, daß die Oberfläche noch unregelmäßiger und höckriger war als 4 Wochen nach UN-Gabe. Dahingegen erscheint die Niere eines Kontrolltieres im Vergleich zur 4. Woche makroskopisch nicht verändert.



Abb. 15:

Nieren 4 Wochen nach UN-Applikation. Kontrollen (Ko UN) (links), UN 0,3 (Mitte) und UN 0,5 (rechts). Die Nieren der UN-Gruppen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößert, zeigen eine granuliert Oberfläche und sind von einem helleren Brauntönen.



Abb. 16:

Nieren 20 Wochen nach UN-Gabe. Kontrollgruppe (Ko UN) (links) und UN 0,5 (rechts). Die Niere der Versuchstiergruppe ist jetzt deutlich kleiner als die der Kontrolle. Die Oberfläche ist granuliert und höckrig. Eine Aufhellung der Farbe ist weiterhin erkennbar.

Gewebeschnitte der Nieren wurden 1, 4, 8, 10 und 20 Wochen nach einmaliger Applikation von 0,5 bzw. 0,3mg UN/100g KG ebenfalls mikroskopisch untersucht. Im Gegensatz zur Histologie der Modelle 5/6 NX und temporäre warme Ischämie zeigten die Tiere der UN 0,5-Gruppe bereits 4 Woche nach UN-Gabe eine mild bis moderat ausgeprägte ungleichmäßig erscheinende interstitielle Nierenfibrose (Abb. 17).

Die Abbildung 18 zeigt einen Gewebeschnitt 10 Wochen nach UN-Gabe. Die fibrotischen Areale beinhalten atrophische Tubuli mit einer verdickten tubulären Basalmembran und einer geringfügigen lymphozytären Infiltration. Betrachtet man die fibrotischen Areale genauer, fallen Tubuli mit hochgradig dilatiertem Lumen auf. Außerdem sind untergehende Glomeruli mit fibrotischem Umbau zu erkennen. Ähnliche Veränderungen fanden sich bereits nach 0,3mg UN/100g KG, die im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich, jedoch im Vergleich zur höheren Dosis weniger ausgeprägt erschienen (nicht dargestellt).

Die Nierenschnitte der Kontrolltiere waren erwartungsgemäß morphologisch nicht verändert (siehe Abb. 5).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die makroskopisch erkennbaren Unterschiede der Gruppen Ko UN, UN 0,3 und UN 0,5 gut mit den entsprechenden histologischen Veränderungen korrelieren.

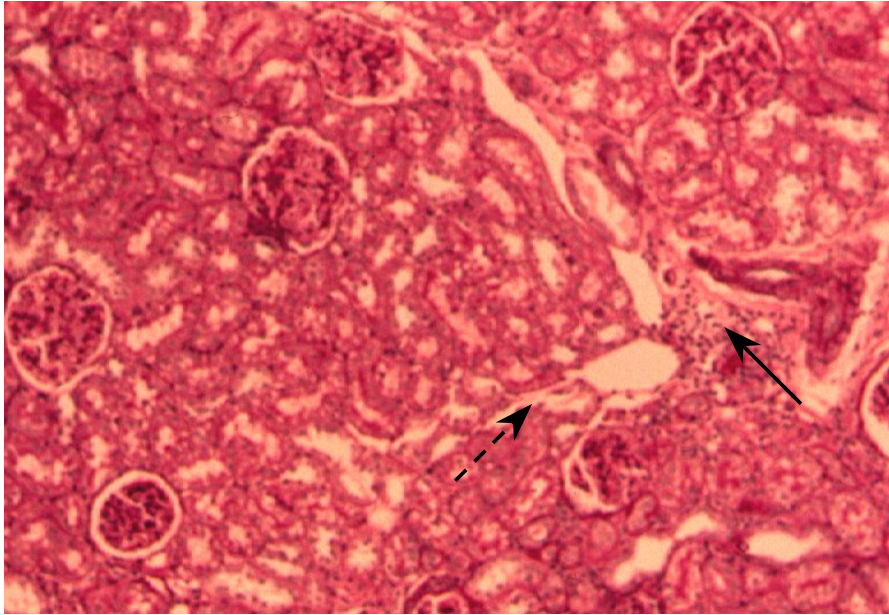


Abb. 17:

Nierenschnitt 4 Woche nach Gabe von 0,5mg UN/100g KG mit einer mild bis moderat ausgeprägten Fibrose (Pfeil, gestrichelt) und lymphozytärer Infiltration (Pfeil, durchgehend) (PAS-Färbung, Vergrößerung 250-fach).

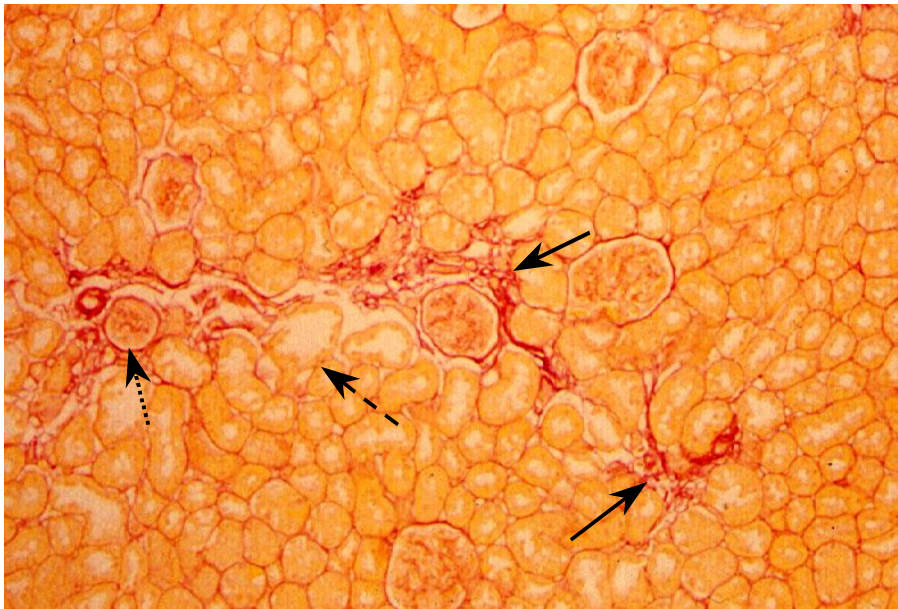


Abb. 18:

Nierenschnitt 10 Wochen nach Applikation von 0,5mg UN/100g KG. Fibrotische Areale (Pfeil, durchgehend), Tubuli mit dilatiertem Lumen (Pfeil, gestrichelt) und der Untergang von Glomeruli (Pfeil, gepunktet) sind dargestellt (Siriusrotfärbung, Vergrößerung 200-fach).

5.4 Einfluß von Halofuginone bzw. Ag 1295 auf die Nierenfunktion von Kontrollratten

Diese Versuchsreihe wurde mit insgesamt 70 Tieren durchgeführt. Die Daten der 24 Kontrolltiere der Gruppe Ko UN stammen aus der Versuchsreihe, die bereits in Kapitel 5.3 beschrieben wurde. Von den 34 Ko Halo-Tieren verstarben 7 während des Versuchszeitraumes, von den 12 Ko Ag 1295-Tieren starben 2. Das entspricht einer Letalitätsrate von 21% bzw. 17%.

5.4.1 Körpergewicht

Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Kontrolltiere für die Uranyl Nitratgruppe (Ko UN) 169 ± 3 g (Abb. 19). Innerhalb der 20 Versuchswochen nahm das Gewicht dieser Tiere kontinuierlich um 49% auf durchschnittlich 252 ± 4 g zu.

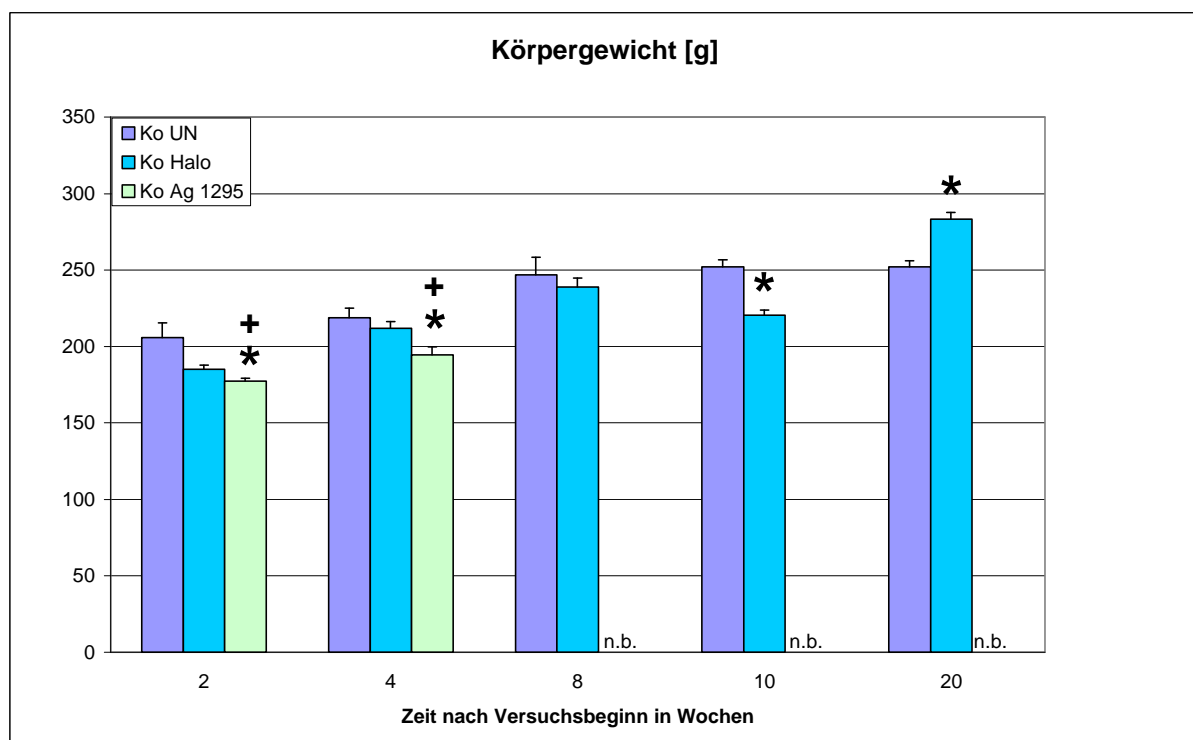


Abb. 19:

Entwicklung des Körpergewichts nach einmaliger i.p. Injektion von NaCl (Ko UN), nach täglicher i.p. Injektion von Halo über 20 Wochen (Ko Halo) und nach täglicher i.p. Injektion von Ag 1295 über 2 Wochen (Ko Ag 1295). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zur Ko UN-Gruppe; + = signifikante Unterschiede zwischen Ko Ag 1295 und Ko Halo ($p \leq 0,05$); n.b. = nicht bestimmt.

Auch für die Kontrolltiere der Halo-Gruppe (Ko Halo) stieg das Körpergewicht während des Versuchszeitraumes an. Diese Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein durchschnittliches Körpergewicht von $146 \pm 5\text{g}$, nach 20 Wochen betrug dieses $283 \pm 4\text{g}$. Dies bedeutet eine Zunahme um 94%. Die relative Gewichtszunahme der Ko Halo-Tiere war somit signifikant höher als die der Ko UN-Gruppe. Mit Ausnahme der 20. Woche nach Versuchsbeginn war das Körpergewicht der Gruppe Ko Halo gegenüber dem der Ko UN-Tiere zu jedem Zeitpunkt geringfügig vermindert. Die Kontrolltiere der Ag 1295 Gruppe (Ko Ag 1295) hatten zwar zu Beginn das geringste Körpergewicht, nahmen aber während der nächsten 4 Wochen um 36% zu, so daß die relative Gewichtsentwicklung den beiden anderen Kontrollgruppen entsprach. Die Versuchsreihe Ko Ag 1295 wurde nach 4 Wochen abgeschlossen, weil zum Zeitpunkt der Versuchsplanung ein Beobachtungszeitraum von 2 Wochen nach der letzten Ag 1295-Gabe für ausreichend angenommen wurde. In der Literatur konnte kein Anhalt für eine optimale Dauer der Applikation von Ag 1295 gefunden werden. Die Befunde rechtfertigen dies (nachträglich) nicht.

5.4.2 Harnvolumen

Die Harnausscheidung der Ko UN-Tiere nahm, wie bereits unter 5.3.2 beschrieben, während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen um 61% ab. Die Ratten der Gruppen Ko Halo und Ko Ag 1295 schieden in der 2. Woche nach Versuchsbeginn 56% bzw. 74% und in der 4. Woche 47% bzw. 39% signifikant weniger Harn aus, als die Tiere der Gruppe Ko UN. Bei den Tieren der Gruppe Ko Halo glich sich die Harnausscheidung in der 8. und 20. Woche den Werten der Gruppe Ko UN an, in der 10. Woche war sie signifikant erhöht (siehe Anhang, Tabellen 6, 9 und 11).

5.4.3 Kreatininclearance

Während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen nahm die Kreatininclearance der UN-Kontrolltiere geringfügig um 15% ab (siehe 5.3.3). Bei der Gruppe Ko Halo war die GFR lediglich in der 4. Woche nach Versuchsbeginn mit $0,41 \pm 0,04\text{ml}/(100\text{g KG} \times \text{h})$ um 39% signifikant niedriger als die der Ko UN-Ratten. Im weiteren Verlauf lag die GFR bei beiden Gruppen im selben Bereich bei Werten zwischen $0,49 \pm 0,05$ und $0,62 \pm 0,16\text{ml}/(100\text{g KG} \times \text{h})$. Die Ko Ag 1295-Tiere zeigten 2 Wochen nach Beginn der Versuche eine um 48% signifikant geringere Kreatininclearance als die Ko UN-Tiere. Nach 4 Wochen erreichte die GFR der Ko Ag 1295-Gruppe wieder die Werte der Ko UN-Gruppe (siehe Anhang, Tabellen 6, 9 und 11).

5.4.4 Renale Proteinausscheidung

Die renale Proteinausscheidung der Ko UN-Tiere war während des gesamten Versuchszeitraumes niedrig und stieg nie über 0,1mg/(100g KG x h) an (siehe 5.3.4). Dies war auch bei den Tieren der Gruppen Ko Halo und Ko Ag 1295 der Fall. Die Proteinurie der Ko Halo-Tiere lag während der ersten 10 Versuchswochen im selben Bereich, wie die Proteinausscheidung der Ko UN-Ratten. 20 Wochen nach Versuchsbeginn schieden die Ratten der Ko Halo-Gruppe signifikant weniger aus, als diejenigen der Ko UN-Gruppe. Die Proteinausscheidung der Tiere der Ko Ag 1295-Gruppe entsprach während der ersten 4 Versuchswochen derjenigen der Ko Halo- und Ko UN-Tiere (siehe Anhang, Tabellen 6, 9 und 11).

5.4.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

In der Gruppe der Ko UN-Tiere war ein Anstieg der OH-Prolinkonzentration von 25 ± 3 auf $44 \pm 2 \mu\text{mol/g}$ Trockengewicht in den 20 Versuchswochen zu verzeichnen. Dies bedeutet eine Zunahme von 76% (Abb. 20).

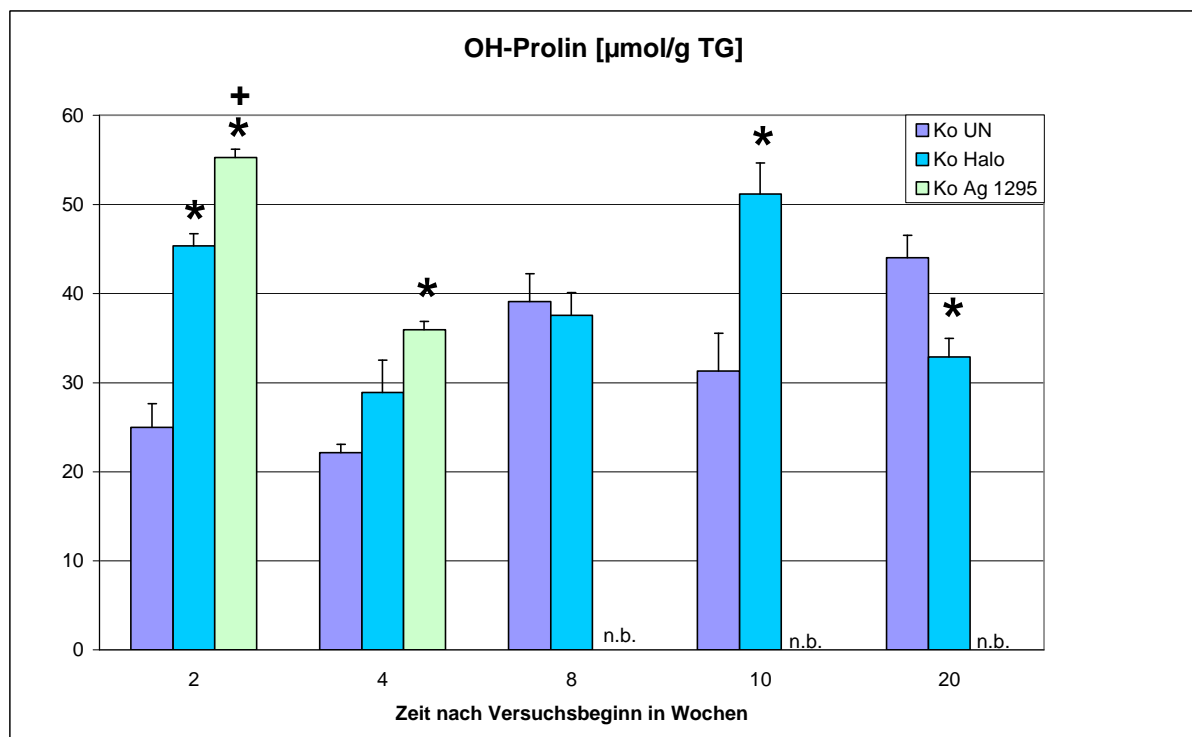


Abb. 20:

OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe nach einmaliger i.p. Injektion von NaCl (Ko UN), nach täglicher i.p. Injektion von Halo über 20 Wochen (Ko Halo) und nach täglicher i.p. Injektion von Ag 1295 über 2 Wochen (Ko Ag 1295). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zur Ko UN-Gruppe; + = signifikante Unterschiede zwischen Ko Ag 1295 und Ko Halo ($p \leq 0,05$); n.b. = nicht bestimmt.

Die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Ko Halo-Tiere war in der 2. Woche um 80% signifikant höher als die der Ko UN-Tiere. In den Wochen 4 und 8 bestanden keine Unterschiede zwischen Ko UN und Ko Halo. In der 10. Woche war die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe mit $51 \pm 3 \mu\text{mol/g TG}$ wiederum signifikant höher als die der Ko UN-Tiere. In der 20. Woche war die OH-Prolinkonzentration der Ko Halo-Gruppe gegenüber den Ko UN-Tieren jedoch signifikant niedriger. Die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der mit Ag 1295 behandelten Ratten war bereits 2 Wochen nach Versuchsbeginn, d.h. mit Abschluß der täglichen i.p. Ag 1295-Injektionen, signifikant höher als die der anderen beiden Kontrollgruppen. Sie erreichte mit $55 \pm 4 \mu\text{mol/g TG}$ den höchsten Wert und war damit um mehr als das zweifache höher, als die Werte der Ko UN-Tiere. Nach weiteren 2 Wochen fiel die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Ko Ag 1295-Tiere auf beinahe die Hälfte ab, war aber immer noch signifikant höher, als diejenige der mit Kochsalz behandelten Ko UN-Tiere.

5.4.6 Morphologie

Eine morphologische Untersuchung des Nierengewebes der Kontrolltiere der Gruppe Ag 1295 erfolgte 2 und 4 Wochen nach Versuchsbeginn. 4 Wochen nach Versuchsbeginn war ein Großteil der Glomeruli ödematös geschwollen (Abb. 21). Des weiteren wurden eine interstitielle Entzündung und dilatierte Tubuli als Zeichen einer weit stärkeren Nierenschädigung nach 4 als nach 2 Wochen sichtbar. Wie bereits in Kapitel 5.3.6 erwähnt, waren die Nierenschnitte der Ko UN-Tiere unverändert und wiesen keinerlei Schädigung auf. Eine histologische Untersuchung der Gruppe Ko Halo zeigte keine pathologischen Befunde im Versuchszeitraum.

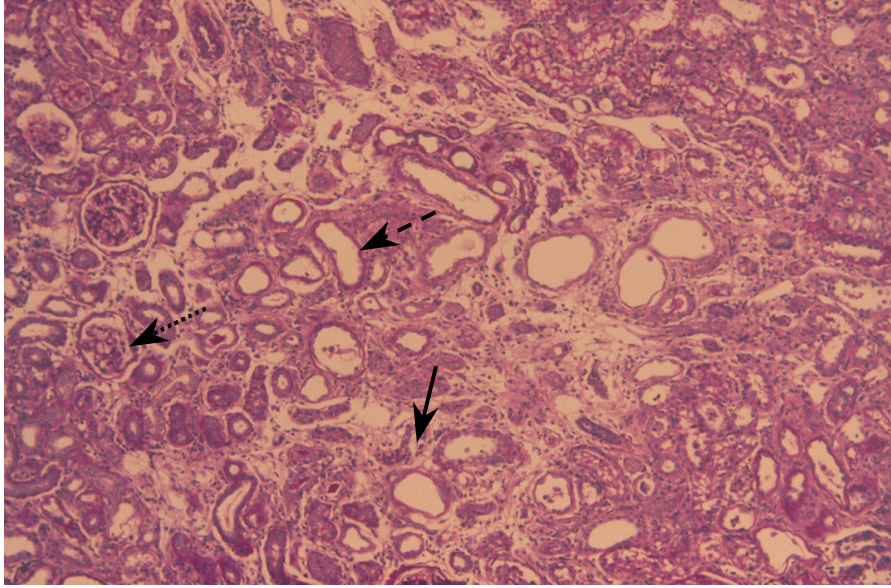


Abb. 21:

Nierenschnitt 4 Wochen nach Beginn der 14 Tage durchgeführten täglichen i.p. Injektion von Ag 1295 mit beginnendem Untergang der Glomeruli (Pfeil, gepunktet), dilatierten Tubuli (Pfeil, gestrichelt) und einer interstitiellen Entzündung (Pfeil, durchgehend) (PAS-Färbung, Vergrößerung 150-fach).

5.5 Einfluß von Ag 1295 auf die Nierenfunktion nach Uranylnitrat-Gabe

Die Versuche der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 wurden mit insgesamt 34 Tieren, von denen 5 starben, durchgeführt. Dies entspricht einer Letalitätsrate von 15%. Diese gleicht in etwa der Rate der Ko Ag 1295-Tiere, ist etwas niedriger als die der UN 0,5-Ratten mit 19%, aber deutlich höher im Vergleich zu den Ko UN-Tieren, die alle überlebten (siehe 5.3).

5.5.1 Körpergewicht

Wie bereits in Kapitel 5.4.1 beschrieben, nahm das Körpergewicht der UN Kontroll-Tiere während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen zu (Abb. 22). Auch das Gewicht der UN 0,5-Ratten stieg innerhalb von 20 Wochen um insgesamt 54% an. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Ko UN und UN 0,5.

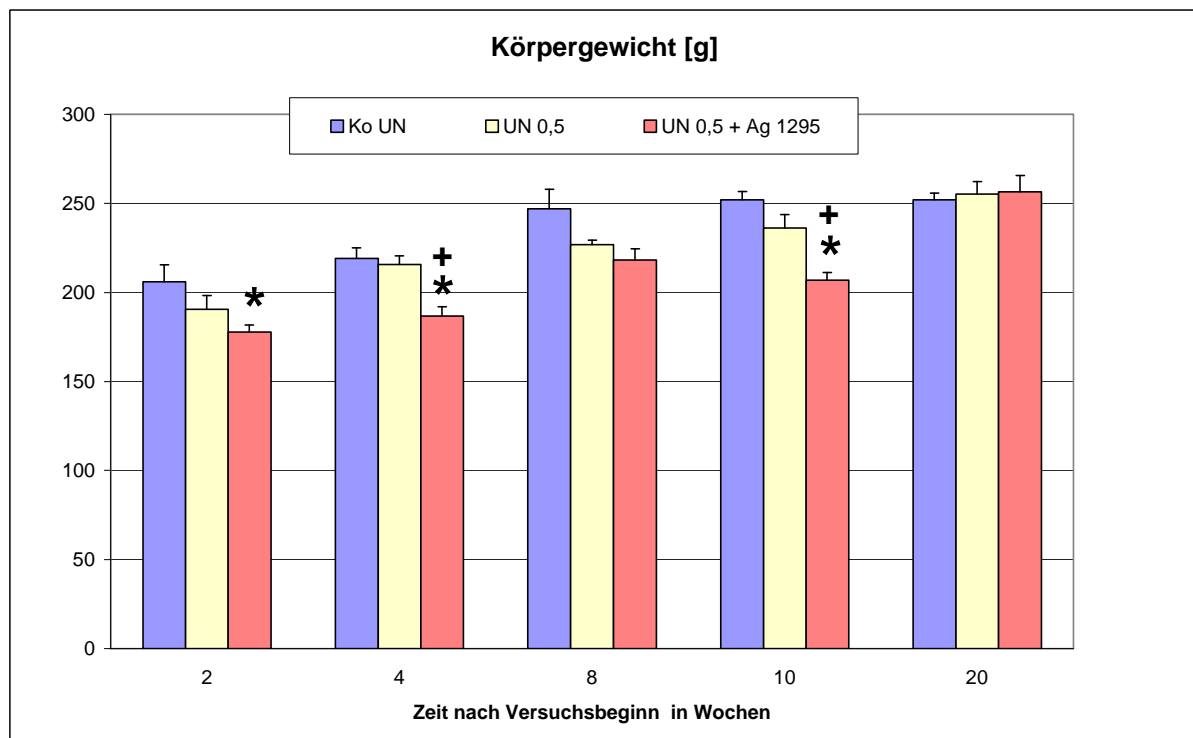


Abb. 22:

Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG ohne (UN 0,5) und mit anschließender täglicher i.p. Gabe von Ag 1295 über 2 Wochen (UN 0,5 + Ag 1295) auf das Körpergewicht von Ratten. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-6$, * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN = NaCl-Gabe); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 und UN 0,5 + Ag 1295 ($p \leq 0,05$).

Auch bei den UN 0,5 + Ag 1295-Tieren war eine stete Zunahme des Körpergewichts um insgesamt 70% zu verzeichnen, wobei die Hälfte der prozentualen Gewichtszunahme erst in den letzten 10 Versuchswochen erfolgte. Zwischen der 2. und der 10. Woche nach

Versuchsbeginn blieb das Körpergewicht der UN 0,5 + Ag 1295-Ratten signifikant niedriger als das der Ko UN-Tiere bzw. der Ko UN- und UN 0,5-Gruppe (Ausnahme: 8. Woche).

5.5.2 Harnvolumen

Während der 20 Versuchswochen ging das Harnvolumen der Gruppe Ko UN um mehr als die Hälfte zurück (siehe 5.3.2). Bei den einmalig mit UN 0,5mg/100g KG behandelten Tieren war ein noch stärkerer Abfall um 86% zu erkennen. Nach anfänglich gleichem Harnvolumen der Ko UN- und UN 0,5-Gruppen, war das ausgeschiedene Volumen der UN 0,5-Tiere in der 8. und 20. Woche um 61% bzw. 67% signifikant niedriger, als das der entsprechenden Kontrolltiere. Die Tiere der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 zeigten eine noch deutlichere Verminderung des Harnvolumens, so daß bereits in der 4. Woche nach Versuchsbeginn nur halb so viel Harn ausgeschieden wurde wie bei der Ko UN- und der UN 0,5-Gruppe. Nach 20 Wochen schieden die UN 0,5 + Ag 1295-Tiere jedoch signifikant mehr Harn aus als die Ko UN- und UN 0,5-Tiere (siehe Anhang, Tabellen 6, 8 und 10).

5.5.3 Kreatininclearance

Die GFR der Gruppe Ko UN nahm während des Versuchszeitraumes um 15% ab (Abb. 23). In der Gruppe UN 0,5 war ab der 4. Woche eine stete Verringerung der Kreatininclearance um 40% zu verzeichnen (siehe 5.3.3). Der Rückgang der GFR der UN 0,5-Tiere war insgesamt stärker ausgeprägt als bei den Ko UN-Tieren. Die Kreatininclearance der UN 0,5-Tiere betrug in der 20. Woche lediglich 56% der Werte der zugehörigen Kontrolltiere. Bei den Tieren der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 war von der 4. bis zur 10. Woche eine Abnahme der Kreatininclearance um 47% zu sehen. In der 10. Woche war die GFR der UN 0,5 + Ag 1295-Tiere sowohl gegenüber der UN 0,5-Gruppe, als auch der Ko UN-Tiere signifikant erniedrigt. In der 20. Woche nach Versuchsbeginn erreichte die Kreatininclearance der UN 0,5 + Ag 1295-Gruppe wieder den Wert der 4. Woche und unterschied sich nicht mehr von der Gruppe Ko UN.

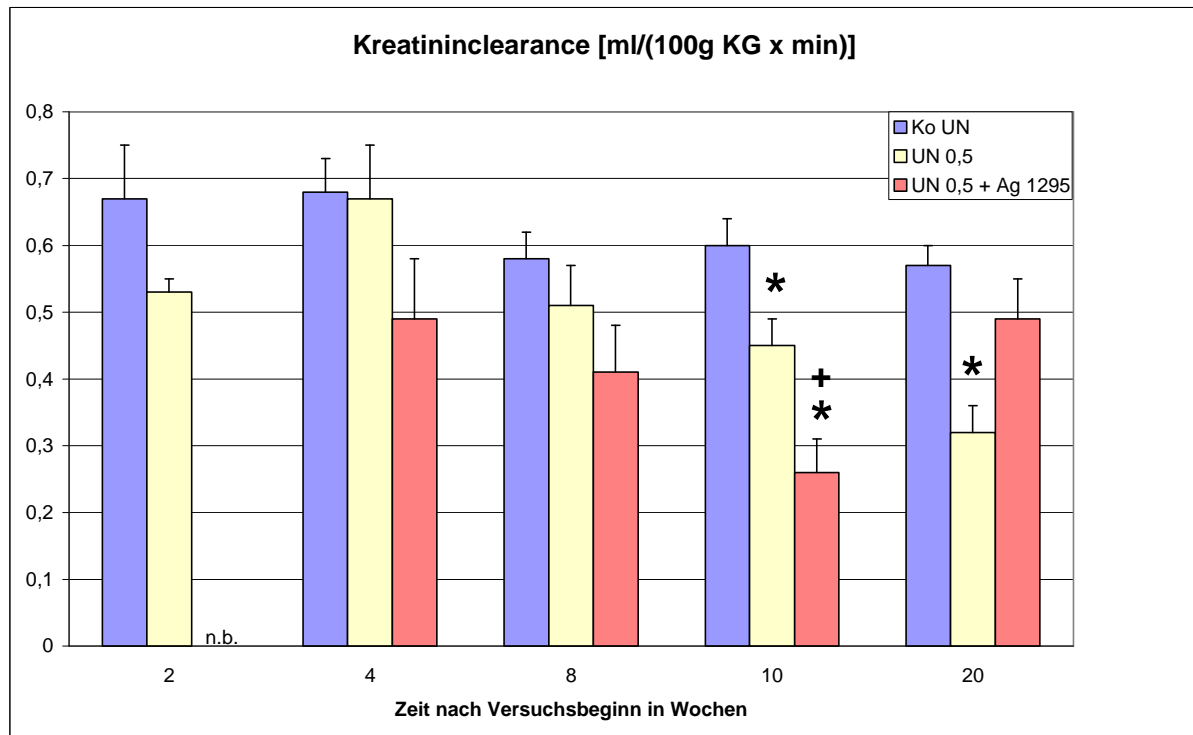


Abb. 23:

Verlauf der Kreatininclearance nach einmaliger i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG ohne (UN 0,5) und mit anschließender täglicher i.p. Gabe von Ag 1295 über 2 Wochen (UN 0,5 + Ag 1295). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-6$; * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN = NaCl-Gabe); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 und UN 0,5 + Ag 1295 ($p \leq 0,05$); n.b. = nicht bestimmt.

5.5.4 Renale Proteinausscheidung

Über den gesamten Versuchszeitraum blieb die Proteinurie der Ko UN-Tiere relativ konstant unterhalb von 0,1mg/(100g KG x h) (Abb. 24). Die Versuchsgruppe UN 0,5 zeigte in den ersten 10 Wochen nur eine geringe, allerdings signifikante Steigerung der Proteinurie. Erst in den letzten 10 Wochen stieg sie um das 3,5-fache an (siehe 5.3.4). Die Proteinurie der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 war über den gesamten Versuchszeitraum deutlich höher als die der Ko UN- und UN 0,5-Tiere. Auch sie stieg bis zur 10. Woche nach Versuchsbeginn nur langsam, bis zur 20. Woche dann deutlich um das 6-fache im Vergleich zur Gruppe Ko UN an. Bereits in der 2. Woche war ein signifikanter Unterschied zwischen UN 0,5 + Ag 1295 und Ko UN bzw. UN 0,5 zu sehen. Dieses Phänomen läßt sich auch in den Wochen 10 und 20 nachweisen.

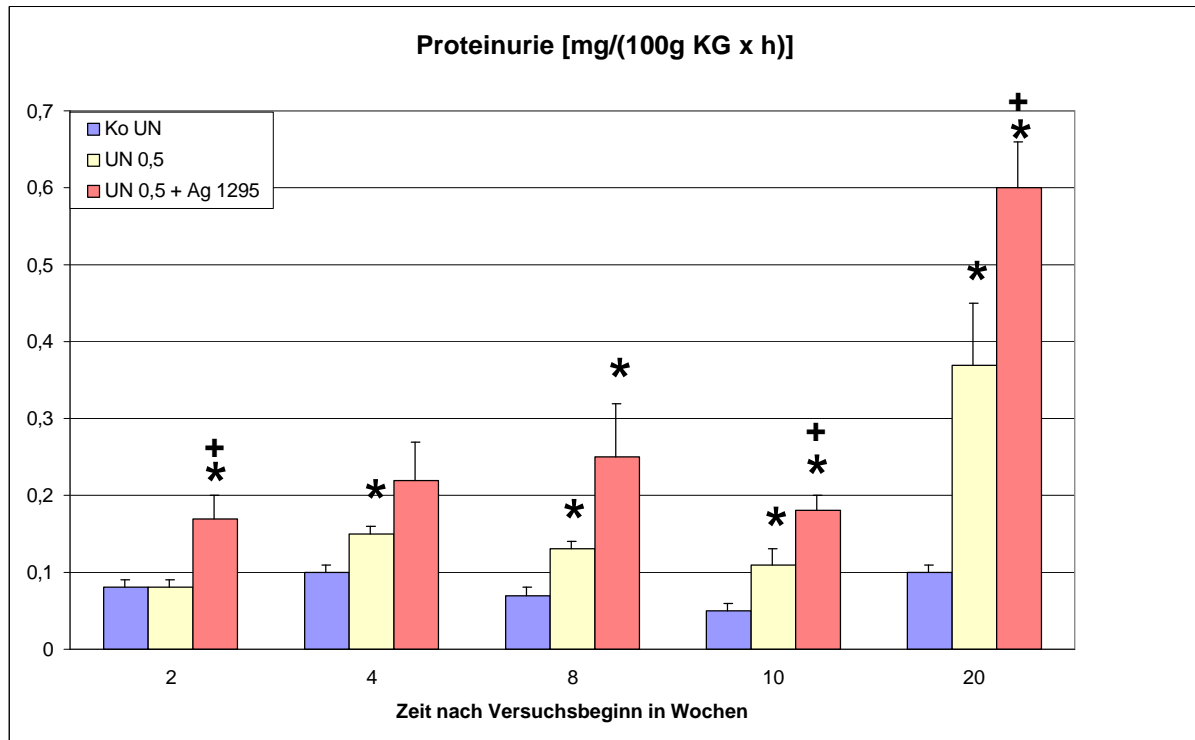


Abb. 24:

Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG ohne (UN 0,5) und mit anschließender täglicher i.p. Gabe von Ag 1295 über 2 Wochen (UN 0,5 + Ag 1295) auf die renale Proteinausscheidung von Ratten. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-6, * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 und UN 0,5 + Ag 1295 ($p \leq 0,05$).

5.5.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

Die OH-Prolinkonzentration stieg bei den Ko UN-Tieren während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen um 76% an (Abb. 25). Von der 2. bis zur 10. Woche post applicationem nahm die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der UN-Tiere zu (siehe 5.3.5). Die Konzentration von OH-Prolin der UN 0,5 + Ag 1295-Gruppe stieg bis zur 8. Woche um 60% an. Im weiteren Verlauf bis zur 20. Woche erreichten die Werte wieder den Kontrollbereich. Auffällig war die insgesamt signifikant höhere OH-Prolinkonzentration der UN 0,5 + Ag 1295-Tiere im Vergleich zu Ko UN-Ratten (Ausnahme: 20. Woche).

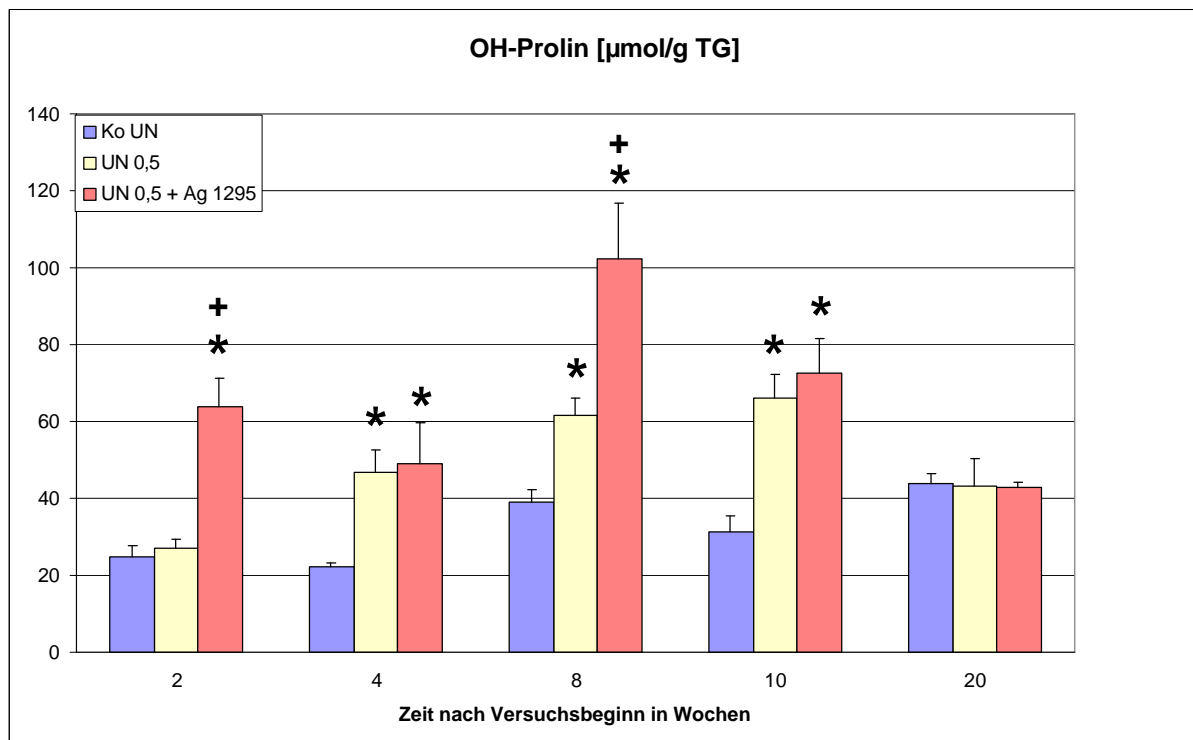


Abb. 25:

Einfluß einer einmaligen i.p. Injektion von 0,5mg UN/100g KG ohne (UN 0,5) und mit anschließender täglicher i.p. Gabe von Ag 1295 über 2 Wochen (UN 0,5 + Ag 1295) auf die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe von Ratten. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=3-6$, * = signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Ko UN); + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 und UN 0,5 + Ag 1295 ($p \leq 0,05$).

5.5.6 Morphologie

Die makroskopischen Veränderungen der Niere durch Ag 1295 werden in Kapitel 5.6.6 beschrieben.

Gewebeschnitte der Nieren von Tieren der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 10 Wochen nach Versuchsbeginn zeigten die stärksten Veränderungen aller histologischen Untersuchungen. Wie in der Abbildung 26 zu sehen, bestand das pathologische Bild einer Glomerulonephrose, d.h. fast alle Glomeruli waren massiv geschädigt, sowohl in den ausgedehnten Narbenfeldern, als auch außerhalb. Mesangium und Kapillarendothelien waren deutlich defekt. Zusätzlich trat eine feintropfige Verfettung sowie eine Entzündungsreaktion mit Lymphozytenansammlungen auf.

Die über den Versuchszeitraum von 20 Wochen fortschreitende Nierenschädigung von Tieren der Gruppe UN 0,5 (siehe 5.3.6) war nach den histologischen Ergebnissen zu jedem Zeitpunkt geringer, als die der oben beschriebenen Nieren. Eine Schädigung der Nieren der Ko UN-Tiere konnte histologisch nicht nachgewiesen werden (siehe 5.3.6).

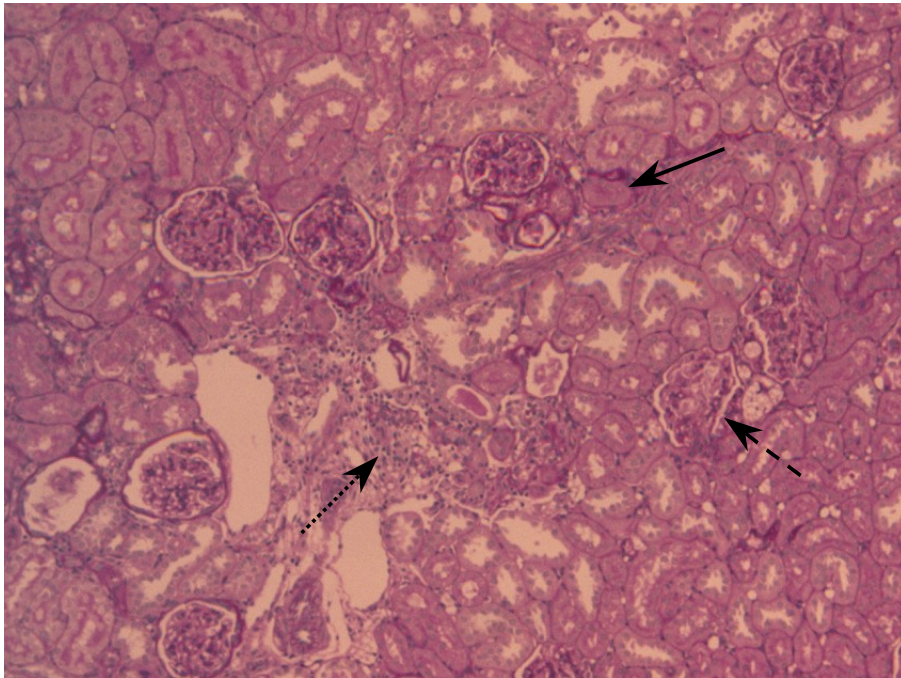


Abb. 26:

Histologie der Niere eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Es finden sich deutliche Narbenbildungen (Pfeil, durchgehend), destruierte Kapillarendothelien und Glomerulonephrose (Pfeil, gestrichelt) sowie eine massive Entzündungsreaktion (Pfeil, gepunktet) (PAS-Färbung, Vergrößerung 200-fach).

5.6 Einfluß von Halofuginone auf die Nierenfunktion nach Uranyl-nitrat-Gabe

Von je 34 UN 0,5 + Halo I- und UN 0,5 + Halo II-Tieren verstarben während der Versuchsreihe 3 bzw. 1 Tier. Die Letalitätssrate dieser Gruppen lag mit 9% und 3% deutlich niedriger als die der UN 0,5- aber auch der Ko Halo-Tiere (siehe 5.4 und 5.3). Insbesondere die geringe Letalität der UN 0,5 + Halo II-Tiere liegt im Bereich der Gruppe Ko UN, von der alle Tiere überlebten (siehe 5.3).

5.6.1 Körpergewicht

Der kontinuierliche Anstieg des Körpergewichts (Abb. 27) der Ko UN- und UN 0,5-Tiere wurde bereits unter 5.5.1 beschrieben. Das Körpergewicht der Gruppen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II stieg zunächst wesentlich langsamer an als das der Ko UN- und der UN 0,5-Ratten.

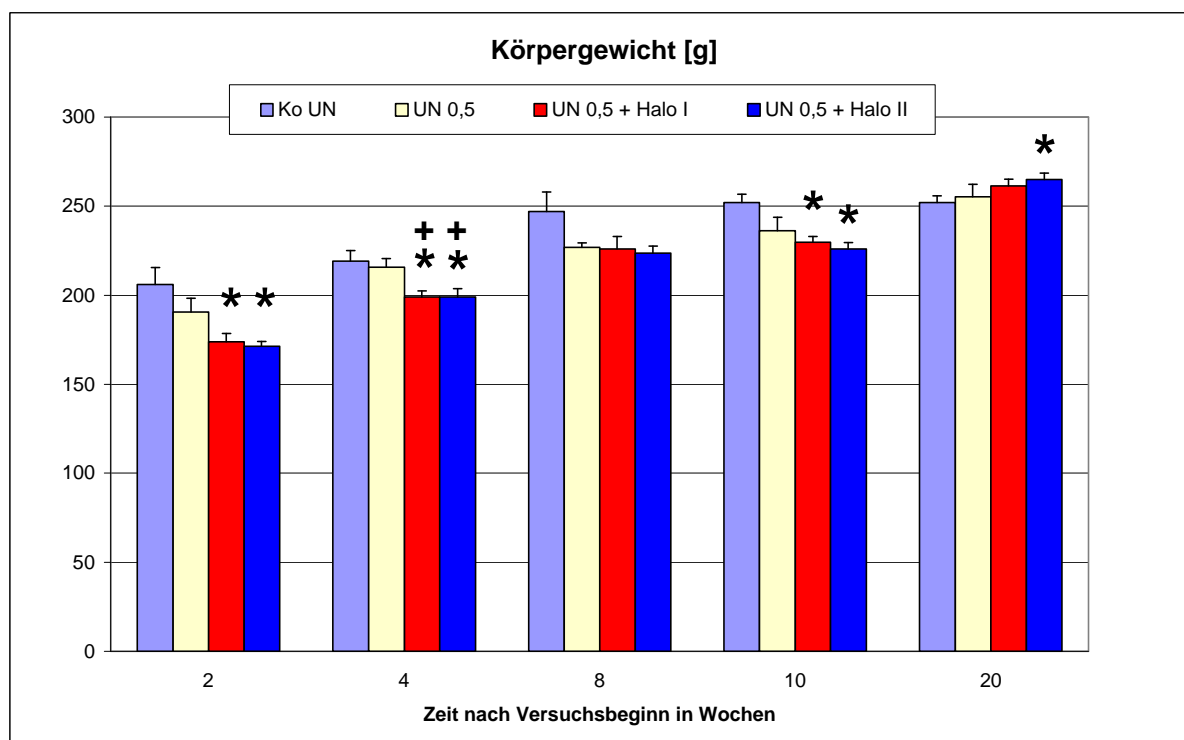


Abb. 27:

Entwicklung des Körpergewichts der Versuchsgruppen UN 0,5 + Halo I (täglich Halo i.p., am 2. Tag einmalig 0,5mg UN/100g KG), UN 0,5 + Halo II (einmalig 0,5mg UN/100g KG, nach 10 Tagen täglich Halo i.p.) und UN 0,5 (einmalig 0,5mg UN/100g KG) im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko UN). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zu Ko UN; + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I bzw. UN 0,5 + Halo II und UN 0,5 ($p \leq 0,05$).

Bereits in der 2. Woche nach Versuchsbeginn war eine signifikante Verminderung des Körpergewichts der Halo Gruppen I und II gegenüber den Ko UN-Tieren zu erkennen. In der 4. Versuchswoche wurde dieser Unterschied noch deutlicher. Hier war das Gewicht der Gruppen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II sowohl gegenüber der Ko UN-Gruppe, als auch gegenüber den UN 0,5-Tieren signifikant vermindert. Wie in der Abbildung 27 zu sehen, glichen sich die Körpergewichte der verschiedenen Gruppen in der 8. Woche einander an. Allerdings wurde in der 10. Versuchswoche nochmals das verminderte Körpergewicht der beiden Halo-Gruppen gegenüber der Ko UN-Gruppe deutlich. Überraschenderweise hatten 20 Wochen nach Versuchsbeginn die Ko UN-Tiere das geringste Körpergewicht. Die Tiere der Gruppe UN 0,5 + Halo II waren zu diesem Zeitpunkt signifikant schwerer, als die Ko UN-Gruppe. Insgesamt stieg das Gewicht der UN 0,5 + Halo I-Tiere in den 20 Wochen um 74%, das der UN 0,5 + Halo II-Tiere um 81% an.

5.6.2 Harnvolumen

Die Reduktion des Harnvolumens in den Versuchsgruppen Ko UN und UN 0,5 während der 20 Wochen des Beobachtungszeitraumes und die signifikante Verminderung der Harnausscheidung der UN 0,5-Tiere im Vergleich zu den Ko UN-Tieren in der 8. und 20. Woche wurde bereits unter 5.5.2 näher beschrieben. Das Harnvolumen der Ratten beider Halo-Gruppen lag während der 20 Versuchswochen konstant bei etwa 0,4ml/(100g KG x h). Lediglich 20 Wochen nach Versuchsbeginn war das Harnvolumen der UN 0,5 + Halo I-Tiere mit $0,63 \pm 0,11 \text{ ml/(100g KG x h)}$ signifikant höher, als das der Ko UN- und der UN 0,5-Tiere. In der 4. Woche war der Harnfluß der UN 0,5 + Halo I-Tiere signifikant niedriger als das Harnvolumen der Ko UN- und der UN 0,5-Tiere. Die UN 0,5 + Halo II-Ratten schieden signifikant weniger Harn aus als die Ratten der Ko UN-Gruppe (siehe Anhang, Tabellen 6, 8, 12 und 13).

5.6.3 Kreatininclearance

Wie unter 5.5.3 beschrieben, nimmt die GFR der Ko UN-Tiere zwischen der 4. und 20. Woche nach Versuchsbeginn ab. Die GFR-Werte der UN 0,5-Tiere liegen unter den Kontrollwerten. 10 und 20 Wochen nach Versuchsbeginn ist diese Verringerung der GFR signifikant. Bei Tieren der Gruppe UN 0,5 + Halo I kommt es bis zur 8. Woche nach Versuchsbeginn zu einer signifikanten Reduktion der Filtrationsleistung (Abb. 28). 10 und 20 Wochen nach UN normalisiert sich die GFR der UN 0,5 + Halo I-Tiere vollständig, so daß sie in der 20. Woche signifikant über den Werten der UN 0,5-Tiere liegt. Ein noch günstigerer

Verlauf zeigt sich bei den Tieren der Gruppe UN 0,5 + Halo II. Hier liegt die GFR zu allen Zeitpunkten im Kontrollbereich, so daß von einer kompletten Aufhebung der schädigenden Wirkung von UN auf die GFR ausgegangen werden kann.

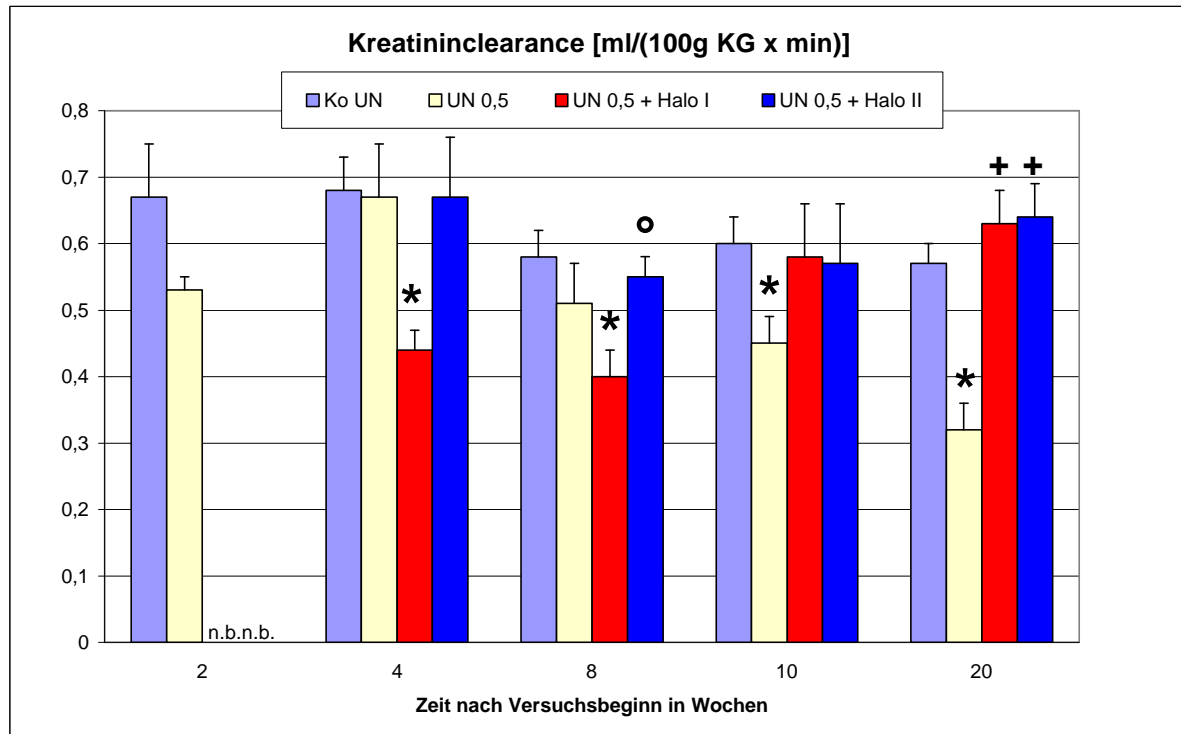


Abb. 28:

Kreatininclearance bei Versuchstieren der Gruppe UN 0,5 + Halo I (täglich Halo i.p., am 2. Tag einmalig 0,5mg UN/100g KG), UN 0,5 + Halo II (einmalig 0,5mg UN/100g KG, nach 10 Tagen täglich Halo i.p.) und UN 0,5 (einmalig 0,5mg UN/100g KG) im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko UN). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zu Ko UN; + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I bzw. UN 0,5 + Halo II und UN 0,5; o = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II ($p \leq 0,05$); n.b. = nicht bestimmt.

5.6.4 Renale Proteinausscheidung

Wie unter 5.5.4 beschrieben, war die Proteinurie der Ko UN-Tiere über den gesamten Versuchszeitraum konstant niedrig ($\leq 0,1 \text{ mg}/(100 \text{ g KG} \times \text{h})$). Die Proteinurie der UN 0,5-Tiere stieg zunächst nur langsam, in den letzten 10 Wochen um ein Vielfaches an und war, mit Ausnahme der 2. Versuchswoche, höher als die der Kontrolltiere (Abb. 29). Die renale Proteinausscheidung der Tiere der UN 0,5 + Halo I-Gruppe stieg bis zur 10. Woche nach Versuchsbeginn signifikant an und näherte sich nach 20 Wochen den Werten der Ko UN-Tiere. Die UN 0,5 + Halo II-Tiere wiesen über den gesamten Versuchszeitraum eine konstant niedrige Proteinurie auf, die in etwa den Werten der Ko UN-Ratten entsprach: $0,06 \pm 0,01$ bis

0,12 ±0,01mg/(100g KG x h). Daraus ergibt sich speziell in der 20. Woche nach Versuchsbeginn eine signifikant niedrigere Proteinausscheidung als bei den UN 0,5-Tieren, was für einen günstigen Einfluß von Halo auf die UN-bedingte Proteinurie spricht.

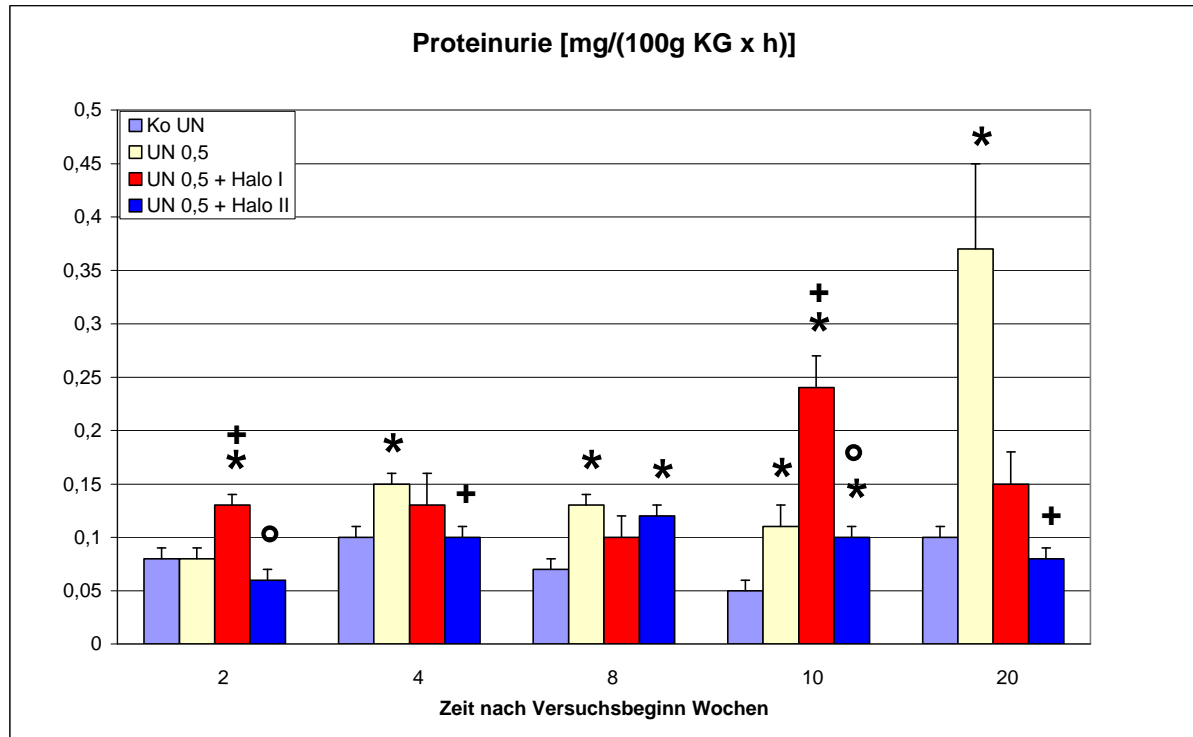


Abb. 29:

Proteinausscheidung im Urin bei Versuchstieren der Gruppe UN 0,5 + Halo I (täglich Halo i.p., am 2. Tag einmalig 0,5mg UN/100g KG), UN 0,5 + Halo II (einmalig 0,5mg UN/100g KG, nach 10 Tagen täglich Halo i.p.) und UN 0,5 (einmalig 0,5mg UN/100g KG) im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko UN). Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zu Ko UN; + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I bzw. UN 0,5 + Halo II und UN 0,5; o = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II (p≤0,05).

5.6.5 Hydroxyprolinkonzentration im Nierengewebe

Der Verlauf der OH-Prolin Konzentration der Tiere der Gruppen Ko UN und UN 0,5 wurde bereits unter 5.5.5 beschrieben. Bei beiden Gruppen war während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen ein Anstieg der OH-Prolinkonzentration festzustellen, wobei es bei der Gruppe UN 0,5 nach 20 Wochen zu einer Normalisierung der Werte kam (Abb. 30). Die OH-Prolin-Konzentration im Nierengewebe der Gruppen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II verlief prinzipiell parallel (Ausnahme: 10. Woche): Zu Beginn war die OH-Prolinkonzentration der beiden Halo-Gruppen um mehr als das Doppelte höher als bei den Ko UN- und UN 0,5-Tieren. Ab der 8. bzw. 10. Woche (UN 0,5 + Halo II bzw. UN 0,5 + Halo I) sank

die Konzentration an OH-Prolin und war in der 20. Woche signifikant niedriger als bei der Ko UN-Gruppe.

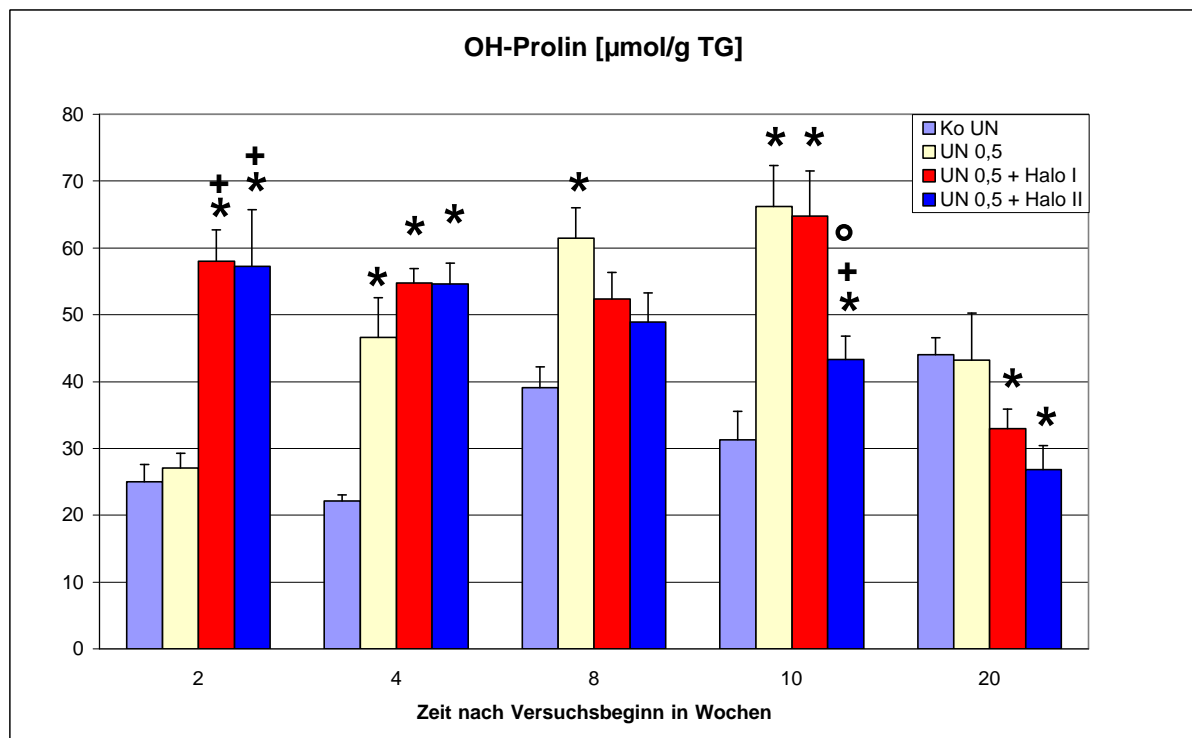


Abb. 30:

OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe: Vergleich der Versuchsgruppen UN 0,5 + Halo I (täglich Halo i.p., am 2. Tag einmalig 0,5mg UN/100g KG), UN 0,5 + Halo II (einmalig 0,5mg UN/100g KG, nach 10 Tagen täglich Halo i.p.) und UN 0,5 (einmalig 0,5mg UN/100g KG) und Kontrolltieren (Ko UN). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3-7, * = signifikante Unterschiede zu Ko UN; + = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I bzw. UN 0,5 + Halo II und UN 0,5; o = signifikante Unterschiede zwischen UN 0,5 + Halo I und UN 0,5 + Halo II ($p \leq 0,05$).

5.6.6 Morphologie

Wie in Abbildung 31 zu erkennen, zeigten die Nieren der mit UN 0,5 und Ag 1295 behandelten Ratten 4 Wochen nach Behandlungsbeginn eine höckrige Oberfläche. Die Nieren waren größer als normal und von hellerer Farbe. Auch bei den Ratten der Gruppe UN 0,5 + Halo I zeigte die Nierenoberfläche diese makroskopischen Veränderungen. Am kleinsten und mit einer beinahe glatten Oberfläche waren die Nieren der Tiere der Gruppe UN 0,5 + Halo II. Verglichen mit dem makroskopischen Aspekt der Nieren von Ko UN-Tieren und UN 0,5-Ratten (siehe Abb. 15) läßt sich feststellen, daß 4 Wochen nach Versuchsbeginn der makroskopische Aspekt der Nieren der UN 0,5 + Ag 1295-Tiere am ehesten dem der Nieren der Gruppe UN 0,5 gleicht. Die Nieren der Gruppe UN 0,5 + Halo I sind denen der UN 0,3-Tiere am ähnlichsten, die der UN 0,5 + Halo II-Tiere denen der Ko UN-Ratten.



Abb. 31: Makroskopische Darstellung der Nieren je eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295, der Gruppe UN 0,5 + Halo I und der Gruppe UN 0,5 + Halo II 4 Wochen nach Versuchsbeginn (von links nach rechts). Die Nieren links zeigen die stärksten Schädigungszeichen mit einer höckrigen Oberfläche sowie einer Vergrößerung und Aufhellung des Brauntons. Nach rechts nehmen diese Veränderungen ab.

Die histologischen Untersuchungen der Nierenschnitte der Gruppe UN 0,5 + Halo I 10 Wochen nach Versuchsbeginn zeigten, wie in Abbildung 32 und 33 zu sehen, fibrotische Areale, eine lymphozytäre Infiltration und kleine Narbenfelder ähnlich der Schädigung bei UN 0,5 (siehe 5.3.6.). Eine Veränderung der Glomeruli war im Gegensatz zu UN 0,5 + Ag 1295 nicht festzustellen.

Zum selben Versuchszeitpunkt war bei den Gewebeschnitten der Nieren von UN 0,5 + Halo II-Tieren kaum eine Veränderung zu erkennen (Abb. 34 und 35). Die Morphologie glich den Nieren von untersuchten Kontrolltieren.

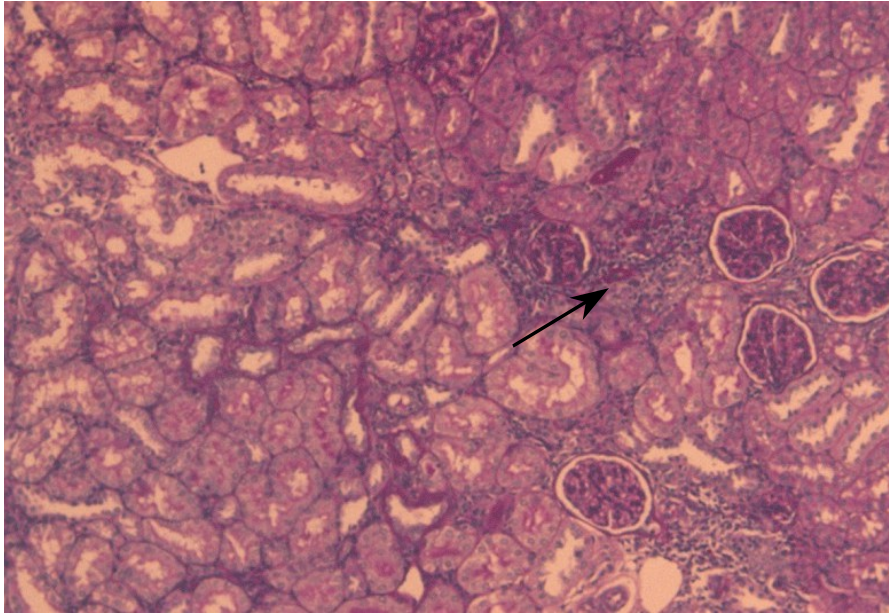


Abb. 32:

Histologisches Nierenpräparat eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Halo I 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Fibrotische Areale ohne Veränderung der Glomeruli und die Lymphozyteninfiltration sind dargestellt (Pfeil) (PAS-Färbung, Vergrößerung 200-fach).

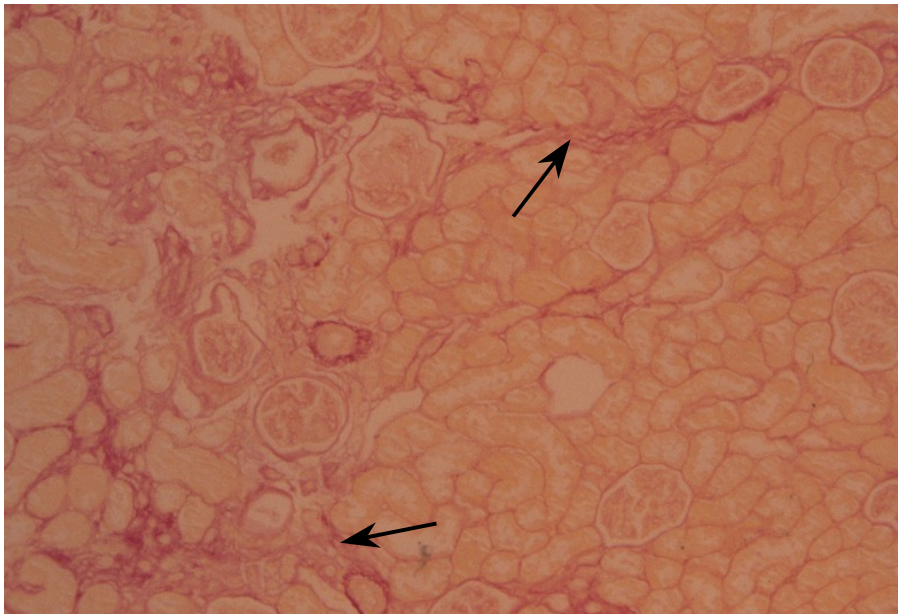


Abb. 33:

Histologisches Nierenpräparat eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Halo I 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Es sind fibrotische Areale (Pfeile), aber keine Schädigung der Glomeruli zu erkennen (Siriusrotfärbung, Vergrößerung 200-fach).

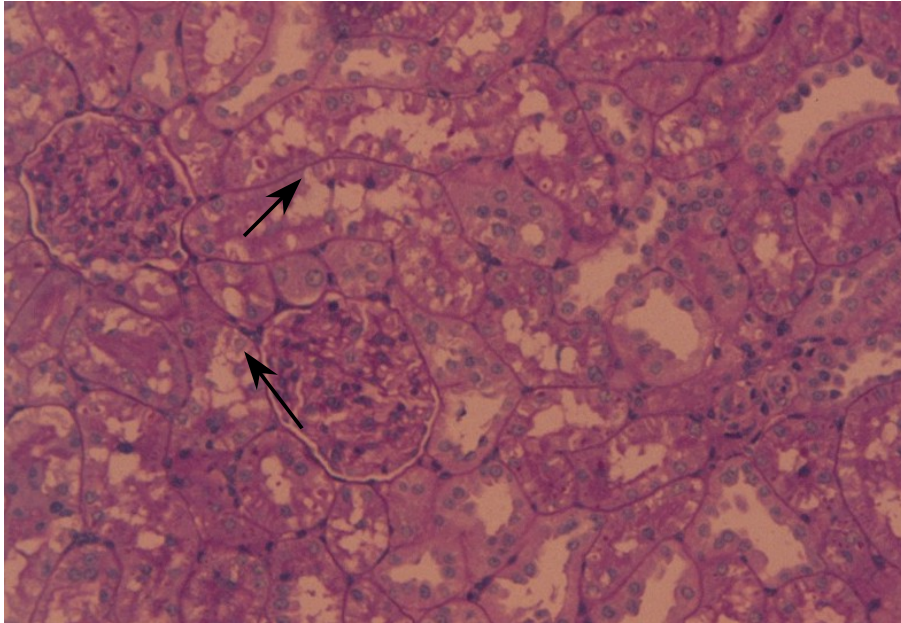


Abb. 34:

Histologisches Nierenpräparat eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Halo II 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Es bestehen minimale Veränderungen, entsprechend einer Kontrollniere mit leichten ödematösen Veränderungen (Pfeile) (PAS-Färbung, Vergrößerung 250-fach).

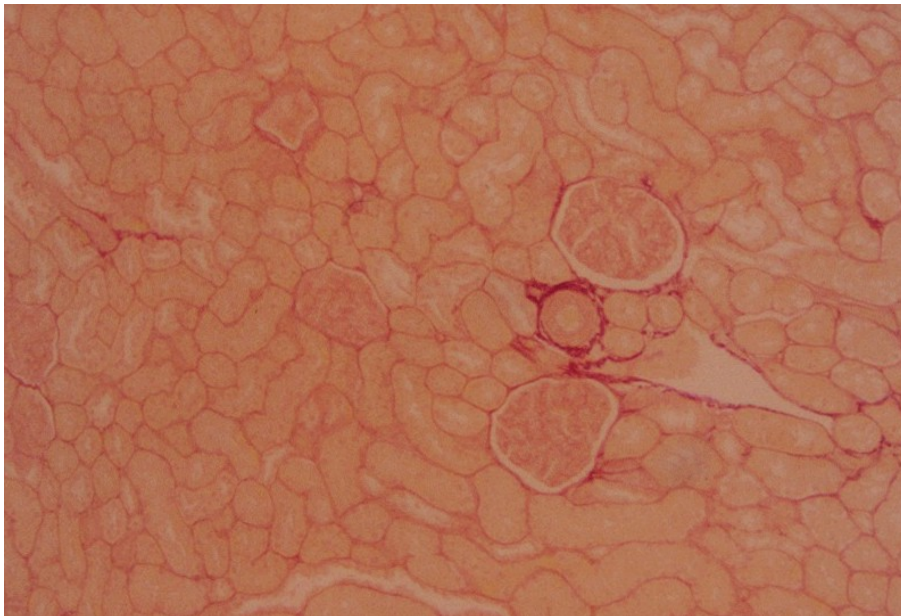


Abb. 35:

Nierenschnitt eines Tieres der Gruppe UN 0,5 + Halo II 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Es sind lediglich Minimalläsionen feststellbar (Siriusrotfärbung, Vergrößerung 200-fach).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Tiermodelle (temporäre warme Ischämie, 5/6 NX, Uranylinitrat-Applikation) zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose an der Rattenniere in Bezug auf mögliche Langzeiteffekte charakterisiert und verglichen.

Im Anschluß an die Versuche zur Etablierung eines geeigneten Tiermodells zur Erzeugung einer Nierenfibrose bei der Ratte wurde ein Modell ausgewählt, mit dem eine mögliche therapeutische Beeinflussung der Fibroseentstehung untersucht werden konnte. Zur Verhinderung der Fibrosierung der Niere wurden Halofuginone (Halo) und Ag 1295 verwendet.

6.1 Tiermodelle zur Erzeugung einer Nierenfibrose

6.1.1 Auswirkungen einer temporären warmen Ischämie auf die Nierenfunktion

Auf Grund der hohen Letalität bei **Isch 45** beziehen sich unsere Betrachtungen in dieser Gruppe auf nur 34% der Versuchstiere, welche die Ischämie überlebt haben. Es ist daher von einer Selektion der Tiere auszugehen, welche die Aussagekraft der Ergebnisse zweifelsohne beeinflusst. Das heißt, die im Folgenden diskutierten Befunde sind an Tieren erhoben worden, welche die Ischämie der Niere offenbar besonders gut kompensieren konnten. Acht Tage nach einer 45-minütigen Ischämie beider Nieren der Ratten beschrieben FLECK und HELLER (1993) ein gegenüber dem Ausgangswert nicht mehr verändertes Harnvolumen. Das Harnvolumen bei Tieren nach 45-minütiger warmer Ischämie und zusätzlicher unilateraler Nephrektomie (Isch 45) war in unseren Untersuchungen 8 und 12 Wochen nach dem Eingriff sowohl gegenüber **Ko Isch** als auch gegenüber **Isch 20** signifikant erniedrigt. Dies spricht für eine initiale Kompensation und für eine subchronische Schädigung der Nieren. Da sich im weiteren Beobachtungszeitraum bis 20 Wochen nach dem Eingriff keine Unterschiede des Harnvolumens bei Kontrolltieren, Isch 20 und Isch 45 mehr zeigten, scheinen Kompensationsvorgänge nach der Ischämie im Vordergrund zu stehen. Im Gegensatz dazu fand sich im untersuchten Zeitraum keine Veränderung der Nierenfunktion nach 20-minütiger Ischämie. Es scheint somit eine Korrelation zwischen dem erniedrigten Harnvolumen und der Dauer der Ischämie zu geben.

Da die Tiere der Ischämiegruppen unilateral nephrektomiert wurden, sind die erniedrigten Kreatininclearance-Werte im Vergleich zu Kontrolltieren mit zwei intakten Nieren (Ko UN) erklärbar. Die GFR ist bei Ratten bis zum Alter von ca. 4 Monaten relativ konstant (ca. 0,8ml/(min/100g KG)) und fällt dann ab. Bei einer Reduktion von Nierengewebe ist die GFR

von der Menge des entnommenen Nierengewebes abhängig. Trotz einer Reduktion der Nierenmasse um 50% kommt es nach einer Woche zu einer Kompensation der GFR bis zu 80% der Kontrollen (FLECK 1999). 12, 16 und 20 Wochen nach temporärer warmer Ischämie von 20 bzw. 45 Minuten und uNX konnten keine Unterschiede der Kreatininclearance im Vergleich zu den unilateral nephrektomierten Kontrolltieren (Ko Isch) festgestellt werden. Die unterschiedlichen Ischämiezeiten bewirkten überraschenderweise ähnliche Veränderungen der GFR, so daß wir keine Abhängigkeit der Einschränkung der GFR von der Schwere der Ischämie feststellen konnten. Dies würde für oben genannte einsetzende Kompensationsmechanismen sprechen. VERCAUTEREN et al. (1999) beschrieben eine signifikante Einschränkung der Kreatininclearance bei Ratten nach 60-minütiger Ischämie und 10 Wochen zuvor erfolgter 5/6 NX verglichen mit Ratten nach 60-minütiger Ischämie ohne 5/6 NX. Dies konnte bis 10 Tage nach Ischämie nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen für effektive Kompensationsmechanismen 10 Wochen nach initialer Schädigung durch die 5/6 NX bzw. uNX, wobei das Kompensationsvermögen auch nach einer zusätzlichen 60-minütigen Ischämiezeit erhalten bleibt.

Ein chronischer Nierenschaden entwickelt sich offensichtlich nur nach einer Ischämie der Niere mit zusätzlicher kontralateraler Nephrektomie. Verantwortlich dafür ist der massive Verlust von Nephronen, der dazu führt, daß das verbliebene Nierengewebe nicht in der Lage ist, die Ischämiefolgen zu kompensieren (AZUMA et al. 1997). Mitverantwortlich für den chronischen Nierenschaden ist wahrscheinlich eine Erhöhung der Konzentration von TGF- β und PDGF im Nierengewebe sowie reaktive Entzündungsprozesse (MEYRIER et al. 1998).

20 Wochen nach 45-minütiger warmer Ischämie zeigte sich bei den überlebenden 34% der Tiere histologisch keine interstitielle Nierenfibrose. FOX (1967) fand dagegen bei Mäusen jeweils 3 und 6 Monate nach temporärer warmer Ischämie von 1, 1,5 und 2 Stunden pathologische Veränderungen in Form von geschädigten Tubuli, Dilatation der Lumina und Rundzellinfiltration sowie eine umschriebene interstitielle Nierenfibrose. Möglicherweise war in unseren Untersuchungen die Ischämiezeit von 20 bzw. 45 Minuten für die Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose zu kurz, oder die Spezies Ratte ist, falls sie die akuten Folgen der Ischämie überlebt, besser in der Lage, die akuten Auswirkungen der Ischämie zu kompensieren.

Die unterschiedlichen Ischämiezeiten von 20 bzw. 45 Minuten korrelierten mit den funktionellen und morphologischen Veränderungen, so daß bei längerer Dauer der warmen Ischämie von einer schwereren Schädigung auszugehen ist. Diese Schlußfolgerung steht im

Einklang mit den Überlebensraten die, wie bereits erwähnt, nach 20 Minuten Ischämie 58% und nach 45 Minuten Ischämie lediglich 34% betrugen.

6.1.2 Auswirkungen der 5/6 Nephrektomie auf die Nierenfunktion

Der Verlust von Nephronen induziert eine Hypertrophie und Hyperfiltration der verbleibenden Nephrone (TOERNIG et al. 1996) sowie eine Invasion von Makrophagen und Lymphozyten. Dabei stellt die Anzahl der infiltrierenden Zellen einen Prognosefaktor für die Entwicklung der Glomerulosklerose dar (HAMAR et al. 1999). Die Hypertrophie des Nierenrestes könnte ein erstes Stadium einer Glomerulosklerose darstellen.

Die nach 5/6 NX fortschreitende Entwicklung einer Urämie ist als Ursache für die geringere Zunahme des Körpergewichtes von Ratten nach 5/6 NX im Vergleich mit Kontrolltieren zu sehen (BRÄUNLICH et al. 1997). Dies ließ sich in unseren Untersuchungen im Beobachtungszeitraum bis 20 Wochen nach 5/6 NX bestätigen. Auch AMANN et al. (1992) wiesen als Zeichen einer chronischen Schädigung 14 Monate nach 5/6 NX eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes um 21% der urämischen Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren nach.

Jedoch fanden AMANN et al. (1995) entsprechend unseren Ergebnissen 2 Wochen nach 5/6 NX keine signifikante Verminderung des Körpergewichtes der Versuchstiere.

Eine Nierenmassenreduktion von 50% führt beim Menschen und bei der Ratte initial erwartungsgemäß zu einem Absinken der GFR auf ca. die Hälfte (NG et al. 1998). Die kompensatorische Hypertrophie der Niere erklärt die im weiteren Verlauf der Kompensation ansteigende GFR nach uNX beim Menschen (KASISKE et al. 1995). Analoge Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit während des Beobachtungszeitraumes von 20 Wochen an Ratten nach 5/6 NX bestätigt werden. Die nach 5/6 Nephrektomie reduzierte GFR führt zu einer erhöhten Plasmakreatininkonzentration sowie zu einer erhöhten Proteinausscheidung (FARAJ und MORLEY 1992; OLDROYD et al. 1999). Die progrediente Proteinurie nach 5/6 NX wurde auch von anderen Autoren beschrieben (ROSSMANN et al. 1990; THOMAS et al. 1998). Eine Ursache stellt möglicherweise die reduzierte Reabsorption von Albumin und anderer Proteine in den renalen Tubuli dar, die trotz eingeschränkter GFR und verminderter Filtration von Proteinen die Rücknahme der Eiweiße aus dem Primärharn nicht aufrecht erhalten können (HOFMANN et al. 2001). In unserer Untersuchung kam es bis 20 Wochen nach 5/6 NX zu einem Anstieg der Proteinausscheidung. Die massive Proteinurie, wie auch die Einschränkung der GFR, läßt auf eine ausgeprägte Schädigung der Nierenfunktion

schließen. Als morphologisches Korrelat fanden sich in den tubulären Epithelien hyaline Proteinzylinder (BRÄUNLICH et al. 1997).

Schon eine Woche nach 5/6 NX konnte ein signifikanter Anstieg der OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe festgestellt werden. Dies deutet auf eine frühe postoperative Zellproliferation hin, was auf eine kompensatorische Hyperplasie hinweist. KLIEM et al. (1996) beschrieben nach 5/6 NX die höchste Proliferationsaktivität im verbleibenden Nierengewebe am 7. Tag nach dem Eingriff. Im weiteren Verlauf kam es zu einem abrupten Abfall der Proliferationsaktivität, die bis zur 10. Woche nach 5/6 NX wieder im Bereich der Kontrollwerte lag. Auch in unseren Untersuchungen ist eine starke Proliferation des Nierenrestes anzunehmen. Dies wird vor allem in der 1. Woche durch die signifikant erhöhte OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe deutlich. Von einer manifesten chronischen Schädigung ist in der 20. Woche nach 5/6 Nephrektomie auszugehen, da ebenfalls ein signifikant erhöhter Wert der OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe festzustellen war, der jedoch hauptsächlich durch das nach 5/6 NX entstandene Narbengewebe an der Oberfläche des verbleibenden Nierenrestes bedingt sein dürfte (vgl. Abb. 10).

OLDROYD et al. (1999) fanden 90 Tage nach subtotaler Nephrektomie eine manifeste Glomerulosklerose und interstitielle Nierenfibrose. Auch JOHNSON et al. (1997) beschrieben eine schwere Nierenfibrose 90 Tage nach subtotaler Nephrektomie an männlichen Wistarratten im Alter von 8-10 Wochen. Die histologische Untersuchung der Nieren unserer Versuchsratten ergab 1, 10 und 20 Wochen nach 5/6 NX keine interstitielle Nierenfibrose. In Übereinstimmung mit der Studie von MODI et al. (1992) zeigten sich neben anderen strukturellen Veränderungen lediglich dilatierte Tubuli.

Für den in dieser Studie verwendeten Rattenstamm ist die 5/6 NX bei weiblichen Tieren somit nicht zur Erzeugung einer Nierenfibrose geeignet, auch wenn die Kreatininclearance-Verminderung und gesteigerte Proteinurie auf einen chronischen Nierenschaden hindeuten. AMANN et al. (1995) konnten nach 5/6 NX histologisch eine Nierenfibrose nachweisen. Jedoch wurden diese Versuche an männlichen Sprague Dawley-Ratten durchgeführt, so daß der Unterschied im Geschlecht der Ratten oder im Rattenstamm begründet sein kann. Möglicherweise liegt es auch an der Vorgehensweise der Operation, da wir mit der 2/3-Resektion der linken Niere begannen und bereits nach 3 Tagen die kontralaterale uNX vornahmen. AMANN et al. (1995) hingegen führten zuerst die uNX durch und nahmen nach 7 Tagen die 2/3-Resektion der kontralateralen Niere vor.

6.1.3 Auswirkungen einer einmaligen Gabe von Uranyl nitrat auf die Nierenfunktion

Die Niere gilt als Prädilektionsstelle der Toxizität von UN. Auf Grund ihres hohen Blutflusses sowie der ausgeprägten metabolischen Aktivität kommt es zur Akkumulation von UN im Nierengewebe. UN reichert sich vor allem im Cortex an (JONES 1966). Schädigungen der Niere durch UN treten vor allem im Glomerulum und im proximalen Tubulus auf (MCDONALD-TAYLOR et al. 1997). Die akuten renalen Auswirkungen von UN sind in mehreren Studien beschrieben worden, wobei mögliche Langzeiteffekte einer einmaligen Exposition meist außer acht bleiben (GILMAN et al. 1998; PAVLOVIC et al. 1998). Unsere Untersuchungen nach einmaliger Gabe von 0,5 (UN 0,5) bzw. 0,3mg UN/100g KG (UN 0,3) ergaben in der Langzeitbeobachtung bis 20 Wochen nach Applikation eine eindeutige Dosisabhängigkeit in Bezug auf funktionelle und morphologische Veränderungen.

BLANTZ (1975) erzeugte bei Ratten mit 1,5 bzw. 2,5mg/100g KG UN i.v. appliziert ein akutes Nierenversagen mit letalem Ausgang am 5. Tag. Er beschrieb dabei einen Abfall der Kreatininclearance unmittelbar nach UN-Gabe. In unseren Untersuchungen trat in der 2., 4. und 8. Woche nach UN-Applikation keine signifikante Erniedrigung der Kreatininclearance auf. Es sind bei dem von uns verwendeten Rattenstamm möglicherweise Kompensationsmechanismen eingetreten, die in dieser Zeit nach Überstehen der initialen Schädigung die Nierenfunktion weitgehend aufrecht erhalten können. Ein anderer Aspekt im Vergleich mit der Studie von BLANTZ (1975) ist die unterschiedliche Applikationsart von UN (intravenös im Gegensatz zu intraperitoneal). OLIVER beschrieb bereits 1915 Regenerationsvorgänge nach Exposition mit UN ab dem 4. Tag. Unsere Ergebnisse zeigten allerdings eine signifikante Verminderung der Kreatininclearance noch in der 10. und 20. Woche nach UN-Applikation. Dies ist als Zeichen einer chronischen Nierenschädigung zu werten. Die beginnenden histologischen Veränderungen limitieren die Effektivität der Kompensationsvorgänge, das heißt die funktionelle Reserve der Niere ist überschritten (GILMAN et al. 1998). Als Marker einer chronischen Niereninsuffizienz können die eingeschränkte GFR sowie die Proteinurie angesehen werden (HIERHOLZER und FROMM 1995; HÖRL 1998).

Die ab der 8. Woche signifikant erhöhte Proteinausscheidung der Gruppe UN 0,5 beruht wahrscheinlich auf mehreren Ursachen. Zum einen ist eine Schädigung der Bürstensaummembran der Tubuluszellen denkbar, zum anderen könnte eine mitochondriale Läsion eine Rolle spielen, die infolge verminderter Energiebereitstellung zu einer verringerten Reabsorption der glomerulär filtrierten Proteine führt (LEGGETT 1989). Dies allein würde allerdings die Proteinurie in der 20. Woche nach UN-Applikation nicht erklären, so daß von

weiteren Veränderungen, wie beispielsweise einer Schädigung der Glomeruli (BLANTZ 1975) ausgegangen werden muß. Primär könnte die erhöhte Ausscheidung von Proteinen auch mit der Ausbildung von Nekrosen der Tubuluszellen assoziiert sein.

Nach einmaliger Applikation der höheren Dosis UN (0,5mg UN/100g KG) konnten wir histologisch nach 4 Wochen eine manifeste Fibrose der Niere zeigen. Für Proliferationsvorgänge und für die Neubildung von Kollagenen spricht auch die im Beobachtungszeitraum ansteigende und signifikant erhöhte OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe. In Analogie dazu beschrieben HALEY et al. (1982) eine sich entwickelnde Nierenfibrose frühestens 8 Wochen nach Applikation von 1mg UN/100g KG s.c.. Nach 20 Wochen fand sich in unseren Untersuchungen eine deutliche Fibrose mit dilatierten atrophischen Tubuli sowie lymphozytärer Infiltration. Schon makroskopisch konnte eine massive Schädigung der mit 0,5mg UN/100g KG vorbehandelten Nieren vermutet werden (Abb. 15 und 16). Die Veränderungen 4 Wochen nach UN-Applikation korrelieren mit den Ergebnissen von JONES (1966), die 28 Tage nach intravenöser Injektion von 0,1mg/100g KG ähnliche Veränderungen der Nieren beschrieben hat. Im Gegensatz dazu konnten GILMAN et al. (1998) nach 4-wöchiger Gabe von UN im Trinkwasser (600mg/l) im Frühstadium keine wesentlichen histologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Erst nach 13 Wochen Versuchsdauer zeigte sich eine Sklerose der glomerulären Kapsel sowie der tubulären Basalmembran. Die geschilderten Befunde nach intraperitonealer, subcutaner, oraler und intravenöser Gabe von UN machen deutlich, daß die UN-Wirkungen an der Niere neben der einmaligen bzw. längerfristigen Gabe auch von der gewählten Applikationsart abhängen.

Für weiterführende Untersuchungen zur Erzeugung fibrotisch veränderter Nieren sollte daher die Applikationsform von UN mit berücksichtigt werden. So ist die Gabe von UN im Trinkwasser für unsere Zielstellung weniger geeignet, da die vom Versuchstier aufgenommene Dosis von Tier zu Tier variieren kann und noch andere Faktoren wie beispielsweise Trinkverhalten und Resorptionsvorgänge im Verdauungstrakt eine Rolle spielen. Zur Erzeugung einer Nierenfibrose mittels UN sollte in weiterführenden Untersuchungen die intraperitoneale oder die intravenöse Applikation gewählt werden.

6.1.4 Vergleich der verschiedenen Tiermodelle zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose

Von den drei untersuchten Tiermodellen zur Erzeugung einer renalen Fibrose sollte ein für weiterführende Untersuchungen geeignetes Modell herausgefunden werden. Kriterium dafür

war die Entstehung einer manifesten interstitiellen Nierenfibrose, wobei auch Tierschutzaspekte und eine gut praktikable Versuchsdurchführung berücksichtigt wurden.

Im Gegensatz zu anderen Studien (FOX 1967; JOHNSON et al. 1997; OLDROYD et al. 1999; VERCAUTEREN et al. 1999, AMANN et al. 1995) konnten wir bei unserem Rattenstamm beim Modell der temporären warmen Ischämie sowie beim Modell 5/6 NX im entsprechenden Versuchszeitraum von 20 Wochen keine manifeste interstitielle Nierenfibrose hervorrufen. Die beiden Versuchsansätze ergaben zwar Hinweise auf eine chronische Nierenschädigung, die angestrebte interstitielle Nierenfibrose ließ sich jedoch histologisch nicht nachweisen, so daß die Modelle für weiterführende Untersuchungen an unserem Rattenstamm nicht geeignet sind. Hinzu kommt die hohe Letalität nach temporärer Ischämie der Niere und die unter Tierschutzaspekten höhere Belastung der Tiere durch Narkose und Operation sowohl bei der Ischämie, als auch bei der 5/6 NX.

Die hohe Letalität beider Ischämiegruppen im Gegensatz zur 5/6 NX (3 Tage Abstand zwischen 2/3-Entfernung der linken Niere und NX rechts) zeigt, daß die Erholungsphase nach der Ischämie scheinbar nicht ausreichend für das Tolerieren der nachfolgenden uNX war. In der Studie von VERCAUTEREN et al. (1999) verstarben postoperativ keine Tiere. Zwischen uNX und der Ischämie lag ein Zeitraum von 10 Wochen. Die Schädigung nach 45-minütiger warmer Ischämie ist verständlicherweise schwerwiegender, so daß im Vergleich mit Isch 20 bei Isch 45 eine höhere Letalität zu verzeichnen war. Auch das Alter der Tiere scheint bei temporärer Ischämie der Niere eine Rolle zu spielen. So konnten FLECK und HELLER (1993) nach bilateraler 45-minütiger Ischämie an 1 und 2 Monate alten Ratten eine höhere Empfindlichkeit der jüngeren Tiere nachweisen.

Die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) ist eine weitere Methode, bei der die Ausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose schon in zahlreichen Studien bestätigt werden konnte (SOMMER und FÜNFSTÜCK 1997; GUO et al. 1999). Die Ligatur eines Ureters verursacht eine Obstruktionsnephropathie mit Abflußbehinderung des Harns, Stase und nachfolgender Hydronephrose mit Ausdehnung des Nierenbeckenkelchsystems. Dadurch entwickelt sich eine Druckatrophie des Nierengewebes. Die Nierendurchblutung wird beeinträchtigt, die GFR nimmt ab, es kommt zur Ausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose mit Schrumpfnierenbildung. Häufig läßt sich nur noch ein sehr schmaler Parenchymsaum finden. Im Extremfall bleibt nur noch die Organkapsel übrig. Dieser Prozeß ist äußerst schmerzhaft und geht teilweise mit Nierenkoliken einher (THOMAS und ULSHÖFER 1996; HEIDBREder und SCHRAMM 1998). Das Modell der UUO erzielt zwar relativ gute Ergebnisse bezüglich der Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose. Auf Grund der hohen

Belastung der Tiere durch die kaum zu verhindernden starken Schmerzen nach der Ligatur halten wir dieses Modell aber aus Tierschutzgründen für weniger gut geeignet, um Therapiestrategien zur Behandlung einer Nierenfibrose näher zu charakterisieren.

Ein weiterer Versuchsansatz zur Erzeugung einer immunologisch bedingten interstitiellen Nierenfibrose bei Ratten wurde von YAMAMOTO et al. (1994) beschrieben. Nach zweimaliger Injektion eines Serums mit Antikörpern gegen Mesangiumzellen fanden sich 10 und 18 Wochen nach Exposition histologische Veränderungen der Nieren im Sinne einer Glomerulosklerose und einer tubulointerstitiellen Fibrose sowie funktionelle Veränderungen entsprechend eines chronischen Nierenversagens.

JONES et al. (1991) konnten eine tubulointerstitielle Nierenfibrose mit erhöhter Expression von TGF- β 1 nach 4-maliger Injektion von Puromycinaminonukleosiden (PAN) (15mg PAN/100g KG an Tag 0; 4,3mg PAN/100g KG an Tag 20, 27 und 34) sowie uNX in den ersten 4 Tagen nachweisen.

Auch die zwei zuletzt beschriebenen Methoden sind schonend für das Tier und führen zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose, sind aber mit einem nicht unerheblichen finanziellen Aufwand verbunden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose besteht in der Applikation von UN. Die Auswirkungen einer einmaligen Gabe von UN in Bezug auf eine akute oder chronische Schädigung der Niere ist bei Ratten abhängig von der applizierten Dosis. In unserer Studie starben nach Applikation von 0,5mg UN/100g KG i.p. 19% der Tiere, nach 0,3mg UN/100g KG i.p. 11% der Ratten. Jedoch bedarf es zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose eine notwendige Mindestdosis. Auf Grund unserer histologischen Ergebnisse arbeiteten wir bei den weiterführenden Untersuchungen an Ratten zur therapeutischen Beeinflussung einer interstitiellen Nierenfibrose mit der höheren Dosis von 0,5mg UN/100g KG.

Für die Tiere erwies sich die einmalige Applikation von UN als relativ schonend im Vergleich zu den beiden anderen von uns verwendeten Modellen. Obwohl UN in mehreren Organsystemen wie z.B. Leber, Schilddrüse oder Knochen nachzuweisen ist, gilt UN als typisches Nephrotoxin. GILMAN et al. (1998) untersuchten neben den Auswirkungen auf die Nieren auch die Effekte auf Leber und Schilddrüse. Nach 91-tägiger Exposition von 600mg UN im Trinkwasser, war eine Konzentration von ca. 1,9 μ g UN/g Organgewicht in der Niere und von ca. 0,85 μ g UN/g Organgewicht im Knochen nachweisbar. In der Leber war die UN-Konzentration zu gering, um sie zu bestimmen. Es zeigten sich in Leber und Schilddrüse lediglich unspezifische reaktive Veränderungen, die in der Leber jedoch dosisabhängig waren.

Nach UN-Applikation entwickelt sich ein vorübergehendes akutes Nierenversagen mit einem Schädigungsmaximum am 5. Tag nach der UN-Gabe. Die Nierenfunktion der Tiere erholt sich bis zum 14. Tag nach UN-Applikation weitgehend (SANO et al. 2000). Die Regeneration der Nierenfunktion der Tiere bis zur 2. Woche nach UN-Gabe zeigte sich auch in unseren Versuchen. Die Ausbildung einer interstitiellen Nierenfibrose konnten wir bereits in der 4. Woche nach Gabe der höheren Dosis von 0,5mg UN/100g KG zeigen. Eine Dosisabhängigkeit der Schwere der funktionellen und strukturellen Veränderungen war somit auch in unseren Versuchen nachweisbar.

Die Synopsis unserer Ergebnisse und die oben genannten Tierschutzaspekte lassen das Modell der einmaligen Applikation von 0,5mg UN/100g KG für die Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose als sehr gut geeignet erscheinen, um in folgenden Untersuchungen verschiedene therapeutische Ansätze zur Vermeidung einer Nierenfibrosierung zu charakterisieren.

6.2 Medikamentöse Beeinflussung der Entstehung einer Nierenfibrose

6.2.1 Auswirkungen von Ag 1295 auf die Nierenfunktion von Kontrollratten

In diesem Versuchsansatz wurde die alleinige Wirkung von Ag 1295, einem selektiven Hemmer der PDGF-Rezeptorkinase und PDGF-abhängigen DNA-Synthese, auf die Nierenfunktion untersucht (**Ko Ag 1295**). Zeitgleich wurde der Einfluß von Ag 1295 auf eine durch UN 0,5 erzeugte Nierenfibrose charakterisiert (UN 0,5 + Ag 1295, siehe 6.2.3). Als Kontrollgruppe dienten die Ko UN-Tiere, da diese lediglich mit Kochsalz behandelt worden sind.

2 Wochen nach Versuchsbeginn waren alle funktionellen Parameter, abgesehen von der Proteinausscheidung, pathologisch verändert. Nach weiteren 2 Wochen waren diese Veränderungen rückläufig.

Dies führte zu der Vermutung einer akuten Nierenschädigung während der ersten beiden Wochen nach Ag 1295 und einer möglichen Regeneration in der 4. Woche. Die Histologie sollte dies bestätigen:

Nach 2 Wochen zeigten sich bei den Ag 1295-Tieren leichte Veränderungen einzelner Glomeruli sowie Läsionen vor allem der juxtamedullären Nephrone. Nach 4 Wochen jedoch war eine noch stärkere Schädigung mit ödematösen, diffus geschädigten Glomeruli und dilatierten Tubuli bei einer interstitiellen Entzündung sichtbar. Dadurch sahen wir die nach den Laboruntersuchungen gestellte Vermutung des akuten Nierenschadens durch Ag 1295 nach 2 Wochen bestätigt, mußten aber die Hypothese einer partiellen Remission nach 4 Wochen verwerfen. Auf Grund dieser Ergebnisse haben wir die Versuchsgruppe Ko Ag 1295 nicht länger als 4 Wochen verfolgt.

Die Untersuchung von Trepidil, einem PDGF-Antagonisten, zeigte keine Unterschiede der Plasmakonzentration und der absoluten Bioverfügbarkeit der Substanz bei nach der Kreatinin-Clearance eingeteilten Versuchsgruppen (THURMAN et al. 1997). D.h., Trepidil kann bei beeinträchtigter Nierenfunktion offensichtlich problemlos gegeben werden und scheint die Niere nicht zu schädigen. Damit unterscheiden sich Trepidil und Ag 1295 bezüglich ihrer renalen Wirkung deutlich voneinander.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei unseren Untersuchungen der Effekte von Ag 1295 auf die Nierenfunktion eine schädigende Wirkung der Substanz auf die Niere gezeigt werden konnte. Somit ist die Anwendung von Ag 1295 am Menschen nicht gerechtfertigt.

Bei oben beschriebener Nephrotoxizität von Ag 1295 ist der Versuchsansatz mit dieser Substanz zur Protektion vor einer UN-bedingten Nierenfibrose (siehe 6.2.3) kritisch zu werten. Dennoch haben wir die Versuche der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 durchgeführt, da die Versuche parallel liefen und derartige Nierenschädigungen durch Ag 1295 bisher nicht beschrieben worden sind. In einer Studie von LUDEWIG et al. (2000) wurde bei Anwendung der selben Dosis Ag 1295 hingegen keine schädigende Wirkung der Substanz beschrieben.

6.2.2 Auswirkungen von Halofuginone auf die Nierenfunktion von Kontrollratten

Mit diesen Untersuchungen sollte die Wirkung von Halofuginone (Halo), einem spezifischen Hemmer der Kollagen-Typ-I-Synthese, auf die intakte Nierenfunktion untersucht werden (**Ko Halo**), um eventuelle Nebenwirkungen von Halo auf die Niere zu erkennen.

Die Abnahme von Kreatininclearance und Harnvolumen sowie die erhöhte OH-Prolinkonzentration ließen eine akute Nierenschädigung zwischen der 2. und 4. Versuchswoche nach Halo vermuten. Entsprechend dieser Hypothese stellten NAGLER et al. (1998) nach 21 Tagen eine geringe Reduktion des Körpergewichts bei Ratten fest, die mit Halo behandelt wurden.

Die leichte Verminderung des Körpergewichts und die Erhöhung von Harnvolumen und OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe in der 10. Versuchswoche könnten auf einen temporären Nierenschaden in der polyurischen Phase hinweisen. Die anderen Laborparameter und die Histologie deuteten aber nicht auf solch eine Veränderung hin.

PINES und NAGLER (1998) konnten nach 52 Tagen keine Verminderung des Körpergewichts bei mit Halo behandelten Mäusen feststellen. Dies spricht gegen eine Nierenschädigung zu diesem Zeitpunkt.

Alle funktionellen Parameter glichen in der 20. Versuchswoche denen der Kontrolltiere und deuteten damit auf eine vollständige Regeneration eines vorübergehenden Nierenschadens hin.

Die histologische Untersuchung der Nieren der Gruppe Ko Halo zeigte während des 20-wöchigen Versuchszeitraumes keine pathologischen Befunde.

Bei unserer Versuchsreihe mit Halo starben 21% der Tiere. Dies ist sogar eine geringfügig höhere Letalitätsrate als bei den UN 0,5-Ratten. In der Literatur konnten vergleichbare Ergebnisse nicht gefunden werden. Da die UN 0,5 + Halo I- und UN 0,5 + Halo II-Ratten eine wesentlich geringere Letalitätsrate aufwiesen, müssen die Ursachen der geringfügig höheren Letalität einer alleinigen Halo-Gabe andere Gründe haben und lassen sich durch unsere Befunde nicht erklären.

Insgesamt ist nach den Laborparametern von einer vorübergehenden Nierenschädigung zwischen der 2. und 4. Versuchswoche durch die Zufuhr von Halo auszugehen, die allerdings kein morphologisches Korrelat hat. Die histologischen Untersuchungen der Nieren der Gruppe Ko Halo zeigten zu keinem Versuchszeitpunkt pathologische Veränderungen. Die Niere scheint sich nach dieser akuten Schädigung zu erholen, so daß in der 20. Versuchswoche die vermutete protektive Wirkung von Halo auf die Niere zu erkennen ist (siehe 6.2.4).

6.2.3 Einfluß von Ag 1295 auf eine durch Uranyl nitrat erzeugte Nierenfibrose

Durch die gleichzeitige Gabe sollte versucht werden, die durch 0,5mg UN/100g KG erzeugte Nierenfibrose therapeutisch positiv zu beeinflussen (**UN 0,5 + Ag 1295**).

NARAGHI et al. (2000) charakterisierten die Wirkung von verschiedenen neuen Antagonisten der Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinase auf die Proliferation von Nieren, insbesondere bei Nierentumoren. Sie konnten gute Ergebnisse mit den Antagonisten Genistein (Antagonist der Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinase mit breitem Spektrum) und Ag 1478 (spezifischer epidermal-growth-factor-antagonist) erzielen. Ag 1295 zeigte in dieser Studie hingegen eine wesentlich schlechtere Wirkung. Wegen der guten Ergebnisse, die mit anderen PDGF-Antagonisten im akuten Stadium von Nierenschäden und bei Überaktivität von PDGF im Rahmen fibrotischer Erkrankungen erzielt wurden (OSTMAN und HELDIN 2001), hatten wir uns zur Durchführung unserer Versuche mit Ag 1295 entschieden, da es sich um einen **selektiven** Hemmer der PDGF-Rezeptorkinase handelt.

In einer Studie von LUDEWIG et al. (2000) konnte eine signifikante Verminderung der durch UUO erzeugten interstitiellen Nierenfibrose durch Ag 1295 nach 14 und 21 Tagen

nachgewiesen werden. Es wurde keine nierenschädigende Wirkung der Substanz beschrieben, die in der selben Dosis wie bei unseren Versuchen angewandt wurde.

Retrospektiv betrachtet wurden jedoch die Ergebnisse von NARAGHI et al. (2000) bestätigt. Ag 1295 ist, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, nephrotoxisch. Die Versuche Ko Ag 1295 und UN 0,5 + Ag 1295 liefen jedoch parallel, so daß uns diese Ergebnisse zu Beginn dieser Untersuchung nicht vorlagen.

Für die im Nachhinein gestellte Hypothese der Addition der nephrotoxischen Wirkung von UN und Ag 1295 mit Entwicklung eines akuten Nierenschadens nach 2-4 Versuchswochen spricht die Verminderung des Körpergewichts, des Harnvolumens und der Kreatininclearance sowie der Anstieg von Proteinurie und OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe zu diesen Zeitpunkten.

In der 20. Versuchswoche waren Harnvolumen und Proteinurie der UN 0,5 + Ag 1295-Ratten signifikant höher als das der Ko UN- und UN 0,5-Tiere. Eine Ödembildung bzw. eine Wassereinlagerung könnte die Ursache der hohen relativen Gewichtszunahme der UN 0,5 + Ag 1295-Tiere in den letzten Versuchswochen (24%) und des erhöhten Harnvolumens 20 Wochen nach Versuchsbeginn sein. Trotz der genannten schädigenden Auswirkungen der Kombination von Ag 1295 und UN auf die Nierenfunktion waren überraschenderweise Kreatininclearance und OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe 20 Wochen nach Versuchsbeginn im Bereich der Werte der Kontrolltiere.

Bezüglich des Körpergewichts der Ratten führten die Versuche von TANAKA et al. (1995) zu ähnlichen Ergebnissen wie von uns beschrieben: Die Gabe des Angiotensin II Rezeptor-Antagonisten L-158,809 zur Beeinflussung des PDGF bei Vorliegen einer durch 5/6 NX induzierten Nierenfibrose führte auch hier zu einer signifikanten Verminderung des Körpergewichts der Ratten nach 4 Wochen. Jedoch gelang ihnen der Nachweis einer starken Verminderung der Nierensklerose im Vergleich zu Nieren der 5/6 NX-Tiere.

Ähnlich unseren Ergebnissen zur Verhinderung der Entstehung eines Nierenschadens, konnten FUTAMURA et al. (1999) in einer Studie mit Trepidil, einem weiteren PDGF-Antagonisten, keine protektive Wirkung bei bestehendem Nierenschaden nachweisen. Durch Trepidil konnte bei einer Nephritis keine Verbesserung der Nierenfunktion erreicht werden. Die Werte von Kreatinin im Serum und BUN bei Tieren mit einer Nephritis waren, unabhängig von einer Therapie mit Trepidil gleichermaßen erhöht. Es konnte lediglich eine signifikante Reduktion der glomerulären Zellen und der für die Proliferation verantwortlichen Zellen 7 Tage nach Therapie einer Nephritis mit Trepidil nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen von FLÖGE et al. (1999) ergaben eine Verminderung der vermehrten Synthese von Extrazellulärmatrix und eine Verringerung von proliferierenden Mesangialzellen als Hinweis einer Regeneration der mit einem weiteren Antagonisten von PDGF β (einem Oligonukleotid-Aptamer) behandelten Glomerulonephritis nach 6 bis 9 Tagen.

Andere Untersuchungen mit einem hoch selektiven PDGF- β -Antagonisten durch OSTENDORF et al. (2001) an männlichen Wistar-Ratten zeigten sowohl die oben beschriebene Verminderung der glomerulären Hypertrophie und die Normalisierung der Proteinausscheidung und der Nierenfunktion im akuten Stadium nach 8 Tagen, als auch eine Reduktion des chronischen Schadens nach 100 Tagen. Sie konnten eine Prävention der Glomerulosklerose, des tubulointerstitiellen Schadens, sowie der Akkumulation von Kollagen-Typ-III und -IV glomerulär und interstitiell nachweisen. Die funktionellen und morphologischen Parameter der untersuchten Tiere glichen nach 100 Tagen denen von gesunden Ratten.

Bei keiner dieser Substanzen wurde eine durch sie hervorgerufene morphologische Veränderung der Nieren berichtet. Aus diesem Grund war es uns zu Beginn der Studie nicht möglich, die Nephrotoxizität von Ag 1295 selbst und die Addition dieser schädigenden Wirkung zu der des Uranylitrats vorherzusehen. Die oben genannten Studien von OSTENDORF et al. (2001) und FLÖGE et al. (1999) wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Außerdem wurde die Nierenfibrose bei OSTENDORF et al. (2001) durch eine uNX mit nach 1 Stunde folgender einmaliger Bolusinjektion eines monoklonalen Antikörpers und bei FLÖGE et al. (1999) lediglich durch die einmalige Injektion eines Antikörpers erzeugt. Daher können die unterschiedlichen Ergebnisse in dem Geschlecht der Tiere oder der Art der Erzeugung der Nierenfibrose begründet sein.

Gewebeschnitte der Nieren von Tieren der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 zeigten zu jedem Versuchszeitpunkt die stärksten morphologischen Veränderungen aller Untersuchungen. 10 Wochen nach Versuchsbeginn bestand das Bild einer Glomerulonephrose und einer feintropfigen Verfettung, eine interstitielle Fibrose konnte allerdings nicht festgestellt werden. D.h., daß Ag 1295 zwar zu einer Reduktion der durch UN 0,5 erzeugten Nierenfibrose führt, aber die Substanz selbst sehr starke Veränderungen der Nieren hervorruft. Da die Schädigungszeichen der Nieren der UN 0,5 + Ag 1295-Gruppe stärker als die der Nieren der Ko Ag 1295-Tiere ausgeprägt waren, ist von einer additiv toxischen Wirkung von UN und Ag 1295 auf Glomeruli und Tubuli auszugehen. Somit bewies die Histologie sowohl den akuten,

als auch den chronischen Nierenschaden und belegt, daß Ag 1295 offensichtlich nicht zur Prävention einer Nierenfibrose geeignet ist.

Auf Grund der Literaturrecherche kommen wir zu dem Schluß, daß eine Hemmung des PDGF-Rezeptors zur Prävention einer Nierenfibrose prinzipiell sinnvoll sein kann. Nach unseren Resultaten jedoch führte Ag 1295 zu keiner Verbesserung sondern eher zu einer beschleunigten Progredienz der Nierenschädigung. Faßt man alle Daten zusammen, so ist sicherlich die nephrotoxische Eigenwirkung von Ag 1295 die wesentliche Ursache für das Ausbleiben des therapeutischen Effektes. Ein weiterer Grund könnte in der gleichzeitigen Applikation von Ag 1295 und Uranyl Nitrat zu sehen sein. Die physiologischen Prozesse zur Überwindung des akuten Nierenschadens werden möglicherweise durch die Anwesenheit von Ag 1295 unterdrückt. Ag 1295 muß deshalb auf Grund seiner schädigenden Eigenwirkung auf die Nieren (siehe 6.2.1) und seiner additiv wirkenden Toxizität bei bestehender Nierenfibrose als ungeeignet zur Therapie betrachtet werden, so daß der klinische Einsatz nicht in Frage kommt.

6.2.4 Einfluß von Halofuginone auf eine durch Uranyl Nitrat erzeugte Nierenfibrose

6.2.4.1 Applikation von Halofuginone gleichzeitig mit Uranyl Nitrat (UN 0,5 + Halo I)

In diesem Therapieansatz wurde Halo täglich über 20 Wochen i.p. injiziert. Die erste Injektion erfolgte einen Tag vor der UN 0,5-Gabe (**UN 0,5 + Halo I**). Hiermit sollte die Entstehung der Nierenfibrose von Beginn an verhindert werden. Dieser Versuchsansatz diente ausschließlich der Grundlagenforschung, da in praxi die Gabe einer protektiven Substanz **vor** Applikation eines Nephrotoxins nur schwer nachvollziehbar ist.

In der 2. bis 4. Versuchswoche wurden Schädigungszeichen an der Niere deutlich. Körpergewicht, Harnvolumen und Kreatininclearance waren gegenüber den Ko UN- und teilweise auch gegenüber den UN 0,5-Tieren vermindert, Proteinurie und OH-Prolinkonzentration waren erhöht. Die Veränderungen entsprachen denen der Ko Halo-Gruppe. 2 Wochen nach Versuchsbeginn war die Proteinurie der Halo I- Ratten höher als die der Ko Halo-Tiere und in der 4. Woche war die OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der Halo I-Tiere signifikant höher als die der Ko Halo-Ratten. Die genannten Laborparameter der Ko Halo-Tiere lagen zu diesen Zeitpunkten im Normbereich. D.h., durch Halo I konnte die durch UN hervorgerufene akute Nierenschädigung zwar reduziert, aber nicht verhindert werden.

Bei Versuchen von BRUCK et al. (2001) wurde Halo männlichen Wistarratten oral verabreicht, um eine Thioacetamid induzierte Leberfibrose zu verhindern bzw. zu behandeln.

Eine vorübergehende Verschlechterung von Parametern, welche die Nierenfunktion charakterisieren, wurde nicht beschrieben. Offensichtlich hat die Applikationsweise Auswirkungen auf die nephrotoxischen Wirkungen von Halo. STECKLAIR et al. (2001) konnten nach oraler Applikation von 300µg Halo/100g KG lediglich 10% der nach i.v. Injektion der gleichen Dosis gemessenen Plasmakonzentration nachweisen. 7 Stunden nach oraler Halo-Applikation war die Substanz nicht mehr nachweisbar, nach i.v. Injektion war Halo in Geweben noch nach 48 Stunden vorhanden. Nach Applikation von 150µg Halo/100g KG bei Mäusen war die Bioverfügbarkeit von Halo nach oraler Applikation 0%, nach i.p. Injektion 100%. Die Ergebnisse sprechen für einen ausgeprägten first pass-Effekt von Halo bei oraler Applikation (STECKLAIR et al. 2001).

NAGLER et al. (1998) führten eine Studie mit Halo oral und i.p. appliziert durch, um zu vergleichen, welche Auswirkungen Halo auf postoperative abdominale Verwachsungen hat. Die Ratten verloren bei i.p. Injektion von Halo (4µg/100g KG) entsprechend unseren Tieren in den ersten Wochen an Körpergewicht. Bei der selben Studie blieb das Körpergewicht der Tiere nach oraler Aufnahme von Halo (500µg/100g KG bzw. 1000µg/100g KG) konstant. Das Ausmaß der Reduktion der Kollagensynthese war bei beiden Applikationsformen gleichartig, allerdings konnte bei oraler Verabreichung eine deutlich geringere Hemmung von abdominalen Adhäsionen festgestellt werden.

Die höhere Konzentration von Halo im Serum bei i.p. Verabreichung ist vermutlich die Ursache der vorübergehenden Nierenschädigung der Ratten nach 2-4 Wochen.

PINES et al. (1997) erzielten nach oraler Applikation von 500µg Halo/100g KG eine Verminderung des Kollagengehalts in der Leber bei Leberzirrhose. Durch die Gabe von Halo konnte die Verminderung des Lebergewichtes reduziert und die Mortalitätsrate gesenkt werden.

Dieses Resultat spricht, entgegen oben genannter Studie von NAGLER et al. (1998), für eine gute Wirksamkeit von Halo auch nach oraler Applikation, wenn seine Wirkung an Stellen gewünscht wird, an die Halo auch nach oraler Gabe zunächst unverändert gelangt.

Da Halo eine dosisabhängige Wirksamkeit zeigt (GRANOT et al. 1993), könnte auch eine Dosisreduktion in Betracht gezogen werden, um temporäre Schädigungen zu verhindern. NAGLER et al. (1999) konnten sowohl die dosisabhängige Wirkung (Reduktion der Adhäsionen um 25% bei einer Dosis von 0,4µg Halo/100g KG i.p., von 45% bei einer Dosis von 2µg Halo/100g KG i.p. und von 78% bei einer Dosis von 4µg Halo/100g KG i.p.), als auch die dosisabhängige Toxizität von Halo zeigen (Körpergewichtsverlust der Ratten ausschließlich nach Gabe der höchsten Halo-Dosis).

Da eine orale Gabe von Halo im Futter bzw. Trinkwasser sehr gut praktikabel und für die Tiere schonend ist, sollte man diese Applikationsform in weiterführenden Untersuchungen als Methode der Wahl in Betracht ziehen. Allerdings gelten dabei die gleichen Einschränkungen (Dosierungsunsicherheiten etc.), wie unter 6.1.3 genannt, so daß eine Schlündelung der Tiere mit definierten Dosierungen möglicherweise optimal wäre.

In der 8. Versuchswoche kam es in unseren Versuchen zu einer Normalisierung fast aller Parameter, die eine Nierenschädigung anzeigen. Lediglich die Kreatininclearance der UN 0,5 + Halo I-Tiere war signifikant niedriger als die der UN-Kontrolltiere. Eine geringe Verminderung des Körpergewichts und ein Anstieg der Proteinurie und der OH-Prolin-Konzentration im Nierengewebe 10 Wochen nach Versuchsbeginn müssen jedoch als Fortbestehen eines subchronischen Nierenschadens gewertet werden. Erst nach 20 Versuchswochen konnte eine deutliche Erholung der Ratten und ihrer Nierenfunktion festgestellt werden.

Makroskopisch glichen die Nieren denen der UN 0,3-Ratten. Sie waren somit geringer als die der UN 0,5-, aber stärker, als die der Ko UN-Tiere geschädigt. Die histologischen Untersuchungen der Nierenschnitte der Gruppe UN 0,5 + Halo I 10 Wochen nach Versuchsbeginn zeigten fibrotische Areale ähnlich der Schädigung bei UN 0,5. Eine Veränderung der Glomeruli war im Gegensatz zu UN 0,5 + Ag 1295 zu keinem Zeitpunkt festzustellen.

Die Letalitätsrate der UN 0,5 + Halo I-Tiere war mit 9% deutlich niedriger als die der UN 0,5-Ratten (19%). Halofuginone scheint also tatsächlich die Nierenfunktion der durch UN 0,5 geschädigten Tiere zu verbessern. Zwar ist eine vollständige restitutio ad integrum nicht möglich, aber zumindest eine Abschwächung der Symptome.

6.2.4.2 Applikation von Halofuginone nach Ende der akuten Phase (UN 0,5 + Halo II)

Im zweiten Versuchsansatz wurde die selbe Dosis Halo (4µg/100g KG) erstmals am 10. Tag nach Verabreichung der einmaligen UN 0,5-Dosis (**UN 0,5 + Halo II**) i.p. injiziert. Dies sollte die Progredienz einer bereits beginnenden Nierenfibrose am Ende des akuten Stadiums verhindern. Dieser Versuchsansatz entspricht der Situation in der Klinik, wenn es nach der ersten Diagnose einer beginnenden Nierenfibrose darauf ankommt, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern.

Die Nieren der Tiere der Gruppe UN 0,5 + Halo II zeigten zwischen der 2. und 4. Versuchswoche nur leichte Schädigungszeichen. In der Gruppe UN 0,5 + Halo II waren Körpergewicht und Harnvolumen leicht vermindert, die OH-Prolinkonzentration im

Nierengewebe erhöht gegenüber der Ko UN- und UN 0,5-Versuchsgruppe. Jedoch lagen die Kreatininclearance und die Proteinurie im selben Bereich wie die der Kontrolltiere. Die Kreatininclearance der 4. Woche war somit deutlich höher, als die der UN 0,5 + Halo I-Tiere. Dies deutet bereits auf positive Auswirkungen von Halo auf die Nierenfunktion hin.

Nach temporärer Verschlechterung der Werte in der 10. Versuchswoche im Vergleich zu den Ko UN-Ratten, die dennoch eher den Normwerten entsprachen als die Werte der UN 0,5 + Halo I-Gruppe, konnte 20 Wochen nach Versuchsbeginn eine fast vollständige Normalisierung der Nierenfunktionsparameter erreicht werden. Dies spricht für einen protektiven Einfluß auf die mit UN 0,5 behandelten Tiere, die zu diesem Zeitpunkt eine ausgeprägte Nierenfibrose aufwiesen. Auch die makroskopische Untersuchung der UN 0,5 + Halo II-Nieren unterstützen diese Annahme. Bereits nach 4 Wochen sahen die Nieren makroskopisch gesund aus und glichen denen der Kontrollgruppe. Bei den Gewebeschnitten der Nieren von UN 0,5 + Halo II-Tieren waren nach 10 Wochen kaum histologische Veränderungen zu erkennen. Die Morphologie glich den Nieren von Kontrolltieren.

Da lediglich eines der 34 Versuchstiere während des Versuchszeitraumes starb, ist auch anhand der Letalitätsrate deutlich die protektive Wirkung von Halo II zu erkennen, die verglichen mit einer Letalität von 19% bei Tieren der Gruppe UN 0,5 vernachlässigbar ist und den Kontrollen entspricht.

BRUCK et al. (2001) untersuchten mit einem ähnlichen Versuchsansatz, d.h. 2 unterschiedlichen Applikationsschemata von Halo, die Wirkung von Halo bei Leberfibrose. Sie charakterisierten einerseits die Wirkung von Halo auf die Entstehung einer Fibrose, wobei sie Halo von Beginn an applizierten, und andererseits die Wirkung bei manifester Fibrose. In diesem Versuch wurde Halo erst nach Ende der 12-wöchigen i.p. Applikation von Thioacetamid für 8 Wochen gegeben. Bei ersterem Versuchsablauf konnten sie eine Verminderung der Ablagerung von Extrazellulärmatrix und eine geringere Kollagensynthese feststellen. Bei unseren Versuchen entspricht die Verminderung der OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe der UN 0,5 + Halo I-Gruppe 20 Wochen nach Versuchsbeginn als Zeichen geringerer Kollagensynthese diesen Ergebnissen und belegt somit die protektive Wirkung von Halo bei der Entstehung einer Fibrose. Noch deutlicher wird die Übereinstimmung der Ergebnisse im zweiten Versuchsansatz: Sowohl unsere histologischen Schnitte der Niere, als auch die Leberschnitte von BRUCK et al. (2001) zeigten eine komplette Remission der Fibrose in Nieren und Leber. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch NAGLER et al. (1996), die eine signifikante Reduktion einer Lungenfibrose nach Therapie mit Halo bei Ratten

nachweisen konnten. Halofuginone wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 42 Tagen i.p. jeden zweiten Tag appliziert. In den ersten 7 Tagen wurde zusätzlich mit einem Abstand von 2 Stunden Bleomycin i.p. verabreicht.

Halo als Hemmer der Kollagensynthese hat nach unseren Ergebnissen zur Prävention einer Nierenfibrose bei frühzeitiger Gabe nach Induktion der Fibrosierung nur geringe Wirkung. Zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. wenn die akuten Effekte des UN bereits abgeklungen sind, kann jedoch durch die Methode Halo II eine Verbesserung der Nierenfunktion und eine Verhinderung der Nierenfibrose erzielt werden. Bei der Anwendung von Halo zur Behandlung einer bereits bestehenden Fibrose nach der akuten Phase ist seine Wirkung als sehr gut zu beurteilen. Hier konnte eine komplette Restitution erreicht werden. Dies läßt für die Therapie der häufig bei der Diagnosestellung bereits manifesten Nierenfibrose große Hoffnung schöpfen und sollte in weiterführenden Untersuchungen eingehend analysiert werden.

6.2.5 Vergleich der Wirksamkeit von Ag 1295 und Halofuginone als Schutz vor einer Nierenfibrose

Vergleicht man die beiden Versuchsansätze UN 0,5 + Ag 1295 und UN 0,5 + Halo I, durch die mit einem ähnlichen Versuchsablauf (Applikation zum gleichen Zeitpunkt, d.h. zum Zeitpunkt der Schädigung) die Entstehung einer Nierenfibrose verhindert werden sollte, so wird die geringere Wirksamkeit bzw. höhere Toxizität von UN 0,5 + Ag 1295 deutlich:

Die Nierenfunktionsparameter der Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 waren zu fast jedem Zeitpunkt stärker pathologisch verändert als die der UN 0,5 + Halo I-Gruppe. Die mit 15% der UN 0,5 + Ag 1295-Tiere im Vergleich zu 9% der UN 0,5 + Halo I-Ratten höhere Letalitätsrate bestärkt diese Aussage.

JOHNSON et al. (1992) beschrieben die Auflösung der Ablagerung von Extrazellulärmatrizen und die Verminderung von Mesangialzellproliferation durch Antikörper gegen PDGF. Hier konnte die Prävention einer Glomerulonephritis erfolgreich im Experiment bewiesen werden. Trotz dieser Erkenntnisse stellt sich unter Einbeziehung unserer Ergebnisse die Frage, ob eine Hemmung der PDGF-Rezeptortyrosinkinase für die Prävention bzw. Therapie einer Fibrose überhaupt sinnvoll ist, oder ob nicht andere Therapieansätze verfolgt werden sollten. Aus diesem Grund haben wir im Folgenden den Vergleich mit anderen Methoden zur Beeinflussung einer Nierenfibrose auf Halo bezogen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Kollagensynthese zu hemmen. Diese erscheinen uns jedoch nach den Ergebnissen der unten beschriebenen Studien nicht so vielversprechend, wie der Einsatz des Kollagensynthesehemmers Halo zu sein:

- Die Möglichkeiten der Beeinflussung der Transkription von Genen, der Translation der mRNA und der Induktion von posttranslationalen Enzymen, die an der Biosynthese von Kollagen beteiligt sind, hatten bisher keinen oder nur geringen Erfolg. Außerdem war die Organspezifität nicht ausreichend hoch genug, um diese Methoden als Therapieprinzip einsetzen zu können (LAPTEV et al. 1994).
- β -Aminopropionitril und D-Penicillamin hemmen beide auf verschiedene Weise das Crosslinking von Kollagenketten und so die Kollagensynthese. Sie sind nicht spezifisch für bestimmte Kollagentypen, hemmen auch die Biosynthese anderer Kollagenarten als Kollagen Typ I und III. Außerdem werden toxische Nebenwirkungen beider Substanzen vermutet. Sie sind deshalb nicht für die Therapie einer Nierenfibrose geeignet (PINES und NAGLER 1998).
- Interferon- γ hatte nur einen geringen kollagensynthesehemmenden Effekt, der mit starken Nebenwirkungen wie z.B. grippeähnlichen Symptomen oder Panzytopenie einherging (POLISSON et al. 1996).
- Colchicin verlangsamt die Sekretion von Kollagen in die Extrazellulärmatrix (KERSHENOBICH et al. 1988). Es verbessert aber weder die Mortalität von Patienten mit Leberfibrose, noch die fibrosebedingten Komplikationen oder die Histologie der Leber. Außerdem ist eine hochdosierte Colchicintherapie mit einer Reihe von bekannten systemischen Nebenwirkungen, wie z.B. starken Diarrhoen mit Tenesmen bis zum Schock oder einer massiven Leukopenie verbunden (RAMBALDI und GLUUD 2001).

Es soll daher nochmals betont werden, daß auch im Vergleich mit anderen antifibrotischen Therapieansätzen sich das Modell UN 0,5 + Halo II als sehr gut erwies. Einige andere Therapiestrategien seien als Beleg dieser Aussage herangezogen:

- Durch eine Glucocorticoid-Therapie wurde die Nierenfunktion von Patienten mit chronischem Nierenschaden verbessert. Die Kreatininkonzentration im Plasma stieg weniger stark an als bei Patienten ohne Glucocorticoid-Therapie und die Zahl der dialysepflichtigen Patienten war nach einem Jahr geringer (VANHERWEGHEM et al. 1996). Die Nebenwirkungen einer langjährigen Corticoid-Therapie können im Einzelfall jedoch zum Therapieabbruch führen.

- Durch die systemische Verabreichung des hepatocyte growth factor Gens mittels Plasmidvektoren wurde die Nierenfunktion bei Nierenfibrose im Tierversuch verbessert, die interstitielle Akkumulation und Ablagerung von Kollagen-Typ-I und Fibronectin, sowie die Expression von fibroseförderndem TGF- β wurden vermindert (YANG et al. 2001). Dieses Therapieprinzip hat bei der Behandlung einer Nierenfibrose sicherlich seine Berechtigung.
- Das Proteoglycan Decorin hemmt TGF- β . Durch den Transfer von Decorin-DNA in den Skelettmuskel von Ratten konnte eine Reduktion der Nierenfibrose erzielt werden, die durch eine Glomerulonephritis entstanden war (ISAKA et al. 1996). TGF- β besitzt auch eine antiproliferative (tumorsuppressive) und antientzündliche Wirkung. Die Gefahr einer Hemmung von TGF- β liegt allerdings in einer überschießenden, evtl. letalen, Entzündungsreaktion (GOLDSCHMEDING et al. 2000).
- JACKSON et al. (1987) untersuchten die Wirkung von Enalapril auf eine durch subtotale Nephrektomie erzeugte Nierenfibrose. Sie konnten eine signifikante Reduktion des Serumkreatinins der mit Enalapril behandelten Tiere im Vergleich zu den nephrektomierten Kontrolltieren während der 6 Versuchswochen zeigen. Auch Proteinurie, GFR und Glomerulosklerose waren nach 6 Wochen weniger stark ausgeprägt. Allerdings waren die Parameter dennoch im Vergleich zu gesunden Ratten geringfügig erhöht.
- Die Wirkung von Verapamil bei einem chronischen Nierenschaden wurde von HARRIS et al. (1987) über 23 Wochen untersucht. Zwar konnte eine höhere Überlebensrate und eine geringfügige Verminderung der histologischen Schäden erzielt werden, aber der glomeruläre Schaden war nicht zu vermeiden und die Proteinurie ließ sich ebenfalls nicht verhindern. Somit ist Verapamil im Vergleich zu UN 0,5 + Halo II bei der Therapie einer Nierenfibrose unterlegen.

Bei unserer Gruppe der UN 0,5 + Halo I-Tiere konnten keine entsprechend guten Ergebnisse wie bei der oben genannten Studie von JACKSON et al. (1987) erreicht werden. Denn nach 2 bis 4 Wochen traten Zeichen einer Nierenschädigung auf. Die UN 0,5 + Halo II-Gruppe zeigte zwar auch zu Beginn leichte Schädigungszeichen, jedoch lagen die Werte von Kreatininclearance, Proteinurie und Morphologie in den ersten 4 Versuchswochen im Kontrollbereich. D.h., die untersuchten Parameter zeigten bei uns unter Therapie mit UN 0,5 + Halo II sogar noch bessere Ergebnisse. Dies unterstreicht die gute Eignung von Halo zur Verlangsamung der Progression einer Nierenfibrose, wenn es entsprechend unserem

Dosierungsschema (UN 0,5 + Halo II) eingesetzt wird. Ob eine völlige Ausheilung erreicht werden kann, muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Faßt man die Untersuchungen zusammen, in denen die oben genannten Arzneimittel zur Prävention einer (renalen) Fibrose eingesetzt worden sind, kann man schlußfolgern, daß Halo als Medikament zur Therapie einer bereits bestehenden Nierenfibrose angewendet werden kann. Nach den bisherigen Ergebnissen ist es gut geeignet, die Progression einer Fibrose zurückzudrängen, so daß weitere Untersuchungen in dieser Richtung einen Durchbruch für die Therapie bringen könnten.

Nach EL NAHAS et al. (1997) waren die verschiedenen Therapieversuche (Hemmung der Monozyteninfiltration der Niere, Hemmung von Adhäsionsmolekülen, Anwendung von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Antikörpern gegen PDGF und TGF- β sowie der Einsatz von Antagonisten des TGF- β 1) im Tierexperiment erfolgreich als Schutz vor einem chronischen Nierenschaden. Allerdings waren sie bei der Anwendung am Menschen wirkungslos. Ein Kollagensynthesehemmer wie Halo wurde am Menschen noch nicht untersucht. Eventuell haben wir mit Halo, appliziert nach dem Schema Halo II, eine erfolgreiche neue Möglichkeit für die Therapie der Nierenfibrose des Menschen gefunden.

7 Schlußfolgerungen

Da fortgeschrittene Nierenerkrankungen sehr häufig zu einem fibrotischen Umbau des Parenchyms führen und derzeit keine adäquaten Therapiestrategien existieren, ist zur Erprobung neuer Therapieansätze ein entsprechendes Tiermodell notwendig, bei dem man eine standardisierte interstitielle Nierenfibrose hervorrufen kann. Wichtig ist dabei eine einfach praktikable und gut reproduzierbare Versuchsdurchführung. Dabei müssen natürlich auch Tierschutzaspekte hinreichend berücksichtigt werden.

Die in unserer Studie untersuchten Tiermodelle **temporäre warme Ischämie** (von 20 bzw. 45 min Dauer) mit unilateraler Nephrektomie, **5/6 Nephrektomie** und **Applikation von UN** (einmalig 0,3 bzw. 0,5mg UN/100g KG) zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich Letalität und Langzeitergebnissen. So erschienen die Modelle temporäre warme Ischämie und 5/6 Nephrektomie weniger geeignet, da in unseren Untersuchungen auch 20 Wochen nach Versuchsbeginn bei beiden Modellen keine interstitielle Nierenfibrose histologisch nachweisbar war.

Nach einmaliger intraperitonealer Applikation von 0,5mg UN/100g KG und Regeneration der Tiere nach der akuten Phase, konnten wir eine manifeste interstitielle Nierenfibrose schon 4 Wochen nach Versuchsbeginn histologisch nachweisen. Anhand funktioneller Parameter wie beispielsweise der Einschränkung der Kreatininclearance, Zunahme der renalen Proteinausscheidung sowie der gesteigerten OH-Prolinkonzentration im Nierengewebe, läßt sich auf eine chronische Nierenschädigung schließen.

Mit dem Modell der einmaligen **Applikation von UN** (0,5mg/100g KG) haben wir daher ein geeignetes, in der Durchführung einfaches und wenig invasives Verfahren zur Erzeugung einer interstitiellen Nierenfibrose bei Ratten gefunden. Dieses Tiermodell kann als gute Basis für weitere Untersuchungen zur Erprobung neuer Therapiestrategien der interstitiellen Nierenfibrose genutzt werden.

Aus diesen Gründen wurden auch die weiterführenden Untersuchungen mit dem Ziel einer therapeutischen Beeinflussung der interstitiellen Nierenfibrose an diesem Modell durchgeführt. Zunächst wurden die zwei Substanzen Ag 1295, ein PDGF-Antagonist, und Halofuginone (Halo), ein spezifischer Hemmer der Kollagen-Typ-I-Synthese, auf eventuelle nephrotoxische Eigenwirkungen untersucht. Zeitgleich wurde die Eignung der Substanzen zur Protektion bzw. Beeinflussung einer UN-induzierten Nierenfibrose getestet.

Eine protektive Wirkung von **Ag 1295** auf die UN-geschädigte Niere konnte nicht nachgewiesen werden. Bereits nach alleiniger i.p. Injektion von Ag 1295 waren

nephrotoxische Wirkungen nachweisbar, so daß diese Substanz nicht für die Therapie einer interstitiellen Nierenfibrose geeignet ist.

Bei den Tieren, die nur **Halo** erhalten hatten, kam es zwar auch zu einer geringgradigen Beeinträchtigung der Nierenfunktion, die jedoch nur 4 Wochen persistierte.

Bei gleichzeitiger Verabreichung von Halo und UN (UN 0,5 + Halo I) zur Protektion der Entstehung einer Nierenfibrose konnte 20 Wochen nach Versuchsbeginn histologisch keine fibrotische Veränderung nachgewiesen werden. Lediglich in der akuten Phase der UN-bedingten Nierenschädigung ergaben sich histologisch und laborchemisch Hinweise auf eine geringgradige Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Damit konnte eine protektive Wirkung von Halo auf die Entstehung einer Nierenfibrose nachgewiesen werden.

Mit dem für die Klinik interessanten Modell, der Applikation von Halo im Intervall von 10 Tagen nach Applikation von UN (UN 0,5 + Halo II), konnte ein günstiger Effekt von Halo auf eine bereits beginnende Nierenfibrosierung nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich auch hier in der akuten Phase minimale Zeichen einer Nierenschädigung, die auf die Wirkung von UN zurückzuführen sind, jedoch waren diese geringer als in allen übrigen Versuchsgruppen. Histologisch konnte eine restitutio ad integrum nach 20 Versuchswochen nachgewiesen werden. Dieser Versuchsansatz ist somit offensichtlich zur Vermeidung der Ausbildung einer manifesten Nierenfibrose geeignet und kann daher für weiterführende Untersuchungen als Positivkontrolle herangezogen werden.

8 Literaturverzeichnis

- AMANN K, WIEST G, ZIMMER G, GRETZ N, RITZ E and MALL G (1992):
Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats – a stereological study.
Kidney Int. 42: 1079-1085
- AMANN K, NEUSUESS R, RITZ E, IRZYNIEC T, WIEST G and MALL G (1995):
Changes of vascular architecture independent of blood pressure in experimental
uremia.
AJH 8: 409-417
- AMANN K, NIEMEIER KA, SCHWARTZ U, TOERNIG J, MATTHIAS S, ORTH SR,
MALL G and RITZ E (1997):
Rats with moderate renal failure show capillary deficit in heart but not skeletal muscle.
Am. J. Kidney Dis. 30: 382-388
- APPENROTH D and BRÄUNLICH H (1986):
Age-dependent qualitative and quantitative changes in physiological proteinuria
in rats.
Z. Versuchstierkd. 28: 77-82
- AZUMA H, NADEAU K, TAKADA M, MACKENZIE HS and TILNEY NL (1997):
Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial
ischemia/reperfusion injury of a single kidney.
Transplant. 64: 190-197
- BAUD L, FOUQUERAY B et BELLOCQ A (1999):
Mécanismes inflammatoires de la fibrose rénale: les glomérulonéphrites.
Bull. Acad. Natle. Méd. 183: 23-31
- BECKER GJ and HEWITSON TD (1997):
The interstitium in renal disease.
J. Int. Med. 242: 93-97
- BLANTZ RC (1975):
The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate.
J. Clin. Invest. 55: 621-635

BOHRER MP, BAYLIS C, HUMES HD, GLASSOCK RJ, ROBERTSON CR and
BRENNER BM (1978):
Permeability of the glomerular capillary wall: facilitated filtration of circulating
polycations.
J. Clin. Invest. 61: 72-78

BRADFORD MM (1976):
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254

BRÄUNLICH H, MARX F, FLECK C and STEIN G (1997):
Kidney function in rats after 5/6 nephrectomy (5/6 NX); effect of treatment with
vitamin E.
Exp. Toxic. Pathol. 49: 135-139

BRUCK R, GENINA O, AEED H, ALEXIEV R, NAGLER A, AVNI Y and PINES M
(2001):
Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats.
Hepatol. 33: 379-386

COHEN EP (1995):
Fibrosis causes progressive kidney failure.
Med. Hypoth. 45: 459-462

CUHACI B, KUMAR MSA, BLOOM RD, PRATT B, HAUSSMAN G, LASKOW DA,
ALIDOOST M, GROTKOWSKI C, CAHILL K, BUTANI L, STURGILL BC and
PANKEWYCZ OG (1999):
Transforming growth factor- β levels in human allograft chronic fibrosis correlate with
rate of decline in renal function.
Transplant. 68: 785-790

EL NAHAS AM (1995):
Pathways to renal fibrosis.
Exp. Nephrol. 3: 71-75

EL NAHAS AM, MUCHANETA-KUBARA EC, ESSAWY M and SOYLEMEZOGLU O
(1997):
Renal fibrosis: Insights into pathogenesis and treatment.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 29: 55-62

FARAJ AH and MORLEY AR (1992):

Remnant kidney pathology after five-sixth nephrectomy in rat.
APMIS 100: 1097-1105

FLECK C (1999):

Determination of the glomerular filtration rate (GFR): Methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances.
Physiol. Res. 48: 267-279

FLECK C and BRÄUNLICH H (1983):

Influence of inhibitors of protein synthesis on restitution of tubular transport capacity after unilateral nephrectomy.
Exp. Pathol. 23: 243-251

FLECK C and BRÄUNLICH H (1984):

Kidney function after unilateral nephrectomy.
Exp. Pathol. 25: 3-18

FLECK C and HELLER J (1993):

Age-dependent differences in the effect of ischaemia on the rat kidney: prevention of the postischaemic damage by different drugs.
Exp. Toxic. Pathol. 45: 381-387

FLÖGE J, OSTENDORF T, JANSSEN U, BURG M, RADEKE HH, VARGESE C, GILL SC, GREEN LS and JANJIC (1999):

Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo: antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephritis by aptamers.
Am. J. Pathol. 154: 169-179

FOX M (1967):

Progressive renal fibrosis following acute tubular necrosis: An experimental study.
J. Urol. 97: 196-202

FUTAMURA A, IZUMINO K, NAKAGAWA Y, TAKATA M and IIDA H (1999):

Effect of the platelet-derived growth factor antagonist trapidil on mesangial cell proliferation in rats.
Nephron 81: 428-433

GEIGER H (1998):

Funktion der Niere. In: CLASSEN M, DIEHL V und KOCHSIEK K (Hrsg.): Innere Medizin, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998), S. 1238-1244

GILMAN AP, VILLENEUVE DC, SECOURS VE, YAGMINAS AP, TRACY BL, QUINN JM, VALLI VE, WILLES RJ and MOSS MA (1998):

Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat.
Toxicol. Sci. 41: 117-128

GÖTZ W (1995):

Transforming growth factor- β : Profil eines renal wirksamen Wachstumsfaktors.
Spektrum d. Nephrol. 1: 3-13

GOLDSCHMEDING R, ATEN J, YASUHIKO I, BLOM I, RABELINK T and WEENING JJ (2000):

Connective tissue growth factor: just another factor in renal fibrosis?
Nephrol. Dial. Transplant. 15: 296-299

GONZÁLEZ-AVILA G, VADILLO-ORTEGA F and PÉREZ-TAMAYO R (1988):

Experimental diffuse interstitial renal fibrosis. A biochemical approach.
Lab. Invest. 59: 245-252

GRANOT I, HALEVY O, HURWITZ S and PINES M (1993):

Halofuginone: An inhibitor of collagen type I synthesis.
Biochem. Biophys. Acta 1156: 107-112

GRÖNE HJ und THOMAS C (1996):

Niere. In: THOMAS C (Hrsg.): Spezielle Pathologie. Schattauer, Stuttgart-New York (1996), S. 331-366

GUO G, MORRISSEY J, McCracken R, TOLLEY T and KLAHR S (1999):

Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy.
Am. J. Physiol. 277: F766-F772

HALEY D (1982):

Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline and water drinking rats.
Lab. Invest. 46: 196-208

HALEY D, BULGER RE and DOBYAN DC (1982):

The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney.
Virchows Arch. Cell Pathol. 41: 181-192

HAMAR P, PETI-PETERDI J, RÁZGA Z, KOVÁCS G, HEEMANN U and ROSIVALL L (1999):

Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems reduces the pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 234-238

HARRIS DCH, HAMMOND WS, BURKE TJ and SCHRIER RW (1987):

Verapamil protects against progression of experimental chronic renal failure.
Kidney Int. 31: 41-46

HEIDBREDER E und SCHRAMM L (1998):

Tubulointerstitielle Nierenerkrankungen. In: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K (Hrsg.): Innere Medizin, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998), S. 1270-1278

HEROLD G (2001):

Nephrologie. In: HEROLD G (Hrsg.): Innere Medizin, Gerd Herold, Köln (2001) S. 494-533

HIERHOLZER K und FROMM M (1995):

Funktionen der Niere. In: SCHMIDT RF, THEWS G (Hrsg.): Physiologie des Menschen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1995) S. 737-777

HÖRL WH (1998):

Diagnostische Verfahren. In: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K (Hrsg.): Innere Medizin, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998) S. 1244-1254

HOFMANN W, EDEL HH, GUDER WG, IVANDIC M und SCHERBERICH JE (2001):

Harnuntersuchungen zur differenzierten Diagnostik einer Proteinurie.
Dtsch. Ärztebl. 98: 637-644

HSU CH, PATEL SR and YOUNG EW (1999):

New phosphate binding agents: Ferric compounds.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1274-1280

IGLESIAS-DE LA CRUZ C, RUIZ-TORRES P, GARCÍA DEL MORAL R, RODRÍGUEZ-PUYOL M and RODRÍGUEZ-PUYOL D (2000):

Age-related progressive renal fibrosis in rats and its prevention with ACE inhibitors and taurine.
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 278: F122-F129

ISAKA Y, BRES DK, ILEGAYA K, KANEDA Y, IMAI E, NOBLE NA and BORDER WA (1996):

Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney.

Nat. Med. 2: 418-423

JACKSON B, WHITTY M, DEBREV L and CUBELA R (1987):

Preservation of renal structure and function in the rat remnant kidney model of chronic renal failure by Enalapril treatment.

Pathol. 19: 38-42

JOHNSON RJ, RAINES EW, FLOEGE J, YOSHIMURA A, PRITZL P, ALPERS C and ROSS R (1992):

Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor.

J. Exp. Med. 175: 1413-1416

JOHNSON TS, GRIFFIN M, THOMAS GL, SKILL J, COX A, YANG B, NICHOLAS B, BIRCKBICHLER PJ, MUCHANETA-KUBARA C and EL NAHAS AM (1997):

The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis.

J. Clin. Invest. 99: 2950-2960

JONES CL, BUCH S, POST M, MCCULLOCH L, LIU E and EDDY AA (1991):

Pathogenesis of interstitial fibrosis in chronic purine aminonucleoside nephrosis.

Kidney Int. 40: 1020-1031

JONES ED (1966):

Microscopic and autoradiographic studies of distribution of uranium in the rat kidney.

Health Physics 12: 1437-1451

KASISKE BL, MA JZ, LOUIS TA and SWAN SK (1995):

Long-term effects of reduced renal mass in humans.

Kidney Int. 48: 814-819

KAUFMAN JM, DI MEOLA HJ, SIEGEL NJ, LYTTON B, KASHGARIAN M and HAYSLETT JP (1974):

Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation.

Kidney Int. 6: 10-17

KERSHENOBICH D, VARGAS F, GARCIA-TSAO G, PEREZ TAMAYO R, GENT M and ROJKIND M (1988):

Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver.

N. Engl. J. Med. 318: 1709-1713

KLIEM V, JOHNSON RJ, ALPERS CE, YOSHIMURA A, COUSER WG, KOCH KM and FLÖGE J (1996):

Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats.

Kidney Int. 49: 666-678

KOVALENKO M, GAZIT A, BÖHMER A, RORSMAN C, RÖNNSTRAND L, HELDIN CH, WALTENBERGER J, BÖHMER FD and LEVITZKI A (1994):

Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse *sis*-transformation.

Cancer Res. 54: 6106-6114

KUNCIO GS, NEILSON EG and HAVERTY T (1991):

Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis.

Kidney Int. 39: 550-556

LAPTEV AV, LU Z, COLIGE A and PROCKOP DJ (1994):

Specific inhibition of expression of a human collagen gene (COL1A1) with modified antisense oligonucleotides. The most effective target sites are clustered in double-stranded regions of the predicted secondary structure for the mRNA.

Biochem. 33: 11033-11039

LEGGETT RW (1989):

The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: A reassessment.

Health Physics 57: 365-383

LEGRAIN M et JACOBS C (1999):

L'insuffisance rénale chronique. Un problème permanent de santé publique.

Bull. Acad. Natle. Méd. 183: 11-22

LEONHARDT H (1990 a):

Binde- und Stützgewebe. In: LEONHARDT H (Hrsg.): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Thieme, Stuttgart-New York (1990) S. 111-154

LEONHARDT H (1990 b):

Harnorgane. In: LEONHARDT H (Hrsg.): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Thieme, Stuttgart-New York (1990) S. 462-482

- LIBERTINO J, ZINMAN L, BRESLIN D, SWINTON N and LEGG M (1980):
Renal artery revascularisation. Restoration of renal function.
JAMA 244: 1340-1342
- LIPPERT H (1993):
Niere. In: LIPPERT H (Hrsg.): Lehrbuch Anatomie, Urban u. Schwarzenberg,
München-Wien-Baltimore (1993) S. 334-353
- LONNEMANN G, SHAPIRO L, ENGLER- BLUM G, MÜLLER GA, KOCH KM and
DINARELLO CA (1995):
Cytokines in human renal interstitial fibrosis. Interleukin-1 is a paracrine growth factor
for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts.
Kidney Int. 47: 837-844
- LUDEWIG D, KOSMEHL H, SOMMER M, BOHMER FD and STEIN G (2000):
PDGF receptor kinase blocker Ag 1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney
after unilateral obstruction.
Cell Tissue Res. 299: 97-103
- MA J, NISHIMURA H, FOGO A, KON V, INAGAMI T and ICHIKAWA I (1998):
Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of
angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction.
Kidney Int. 53: 937-944
- MCDONALD-TAYLOR CK, SINGH A and GILMAN A (1997):
Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: A quantitative analysis.
Toxicol. Pathol. 25: 381-389
- MEYRIER A (1999):
Mécanismes vasculaires de la fibrose rénale. Néphrovasculopathies et hypertension
artérielle.
Bull. Acad. Natle. Méd. 183: 33-46
- MEYRIER A, HILL GS and SIMON P (1998):
Ischemic renal diseases: New insights into old entities.
Kidney Int. 54: 2-13
- MODI KS, SCHREINER GF, PURKERSON ML and KLAHR S (1992):
Effects of probucol in renal function and structure in rats with subtotal kidney
ablation.
J. Lab. Clin. Med. 120: 310-317

- MORAN K, MULHALL J, KELLY D, SHEEHAN S, DOWSETT J, DERVAN P and FITZPATRICK JM (1992):
Morphological changes and alterations in regional intrarenal blood flow induced by graded renal ischemia.
J. Urol. U.S.A. 148: 463-466
- MÜLLER GA, SCHETTLER V, MÜLLER CA and STRUTZ F (1996):
Prevention of progression of renal fibrosis: How far are we?
Kidney Int. Suppl. 54: 75- 82
- NAGLER A, BULGER RE, CUTLER RE, JERVIS HR and BENDITT EP (1973):
Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit.
I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes.
Lab. Invest. 28: 456-467
- NAGLER A, FIRMAN N, FEFERMAN R, COTEV S, PINES M and SHOSHAN S (1996):
Reduction in pulmonary fibrosis in vivo by halofuginone.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1082-1086
- NAGLER A, RIVKIND A, RAPHAEL J, LEVI-SCHAFFER F, GENINA O, LAVELIN I and PINES M (1998):
Halofuginone – an inhibitor of collagen type I synthesis – prevents postoperative formation of abdominal adhesions.
Ann. Surg. 227: 575-582
- NAGLER A, GENINA O, LAVELIN I, OHANA M and PINES M (1999):
Halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis, prevents postoperative adhesion formation in the rat uterine horn model.
Am. J. Obstet. Gynecol. 180: 558-563
- NARAGHI S, KHOSHYOMN S, DE MATTIA JA and VANE DW (2000):
Receptor tyrosine kinase inhibition suppresses growth of pediatric renal tumor cells in vitro.
J. Pediatr. Surg. 35: 884-890
- NARAYANAN S and APPLETON HD (1980):
Creatinine: a review.
Clin. Chem. 26: 1119-1126

- NG YY, HUANG TP, YANG WC, CHEN ZP, YANG AH, MU W, NIKOLIC-PATERSON DJ, ATKINS RC and LAN HY (1998):
Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats.
Kidney Int. 54: 864-876
- OKADA H, STRUTZ F, DANOFF TM and NEILSON EG (1996 a):
Possible pathogenesis of renal fibrosis.
Kidney Int. Suppl. 54: 37-38
- OKADA H, STRUTZ F, DANOFF TM, KALLURI R and NEILSON EG (1996 b):
Possible mechanisms of renal fibrosis.
Contrib. Nephrol. 118: 147-154
- OLDROYD SD, THOMAS GL, GABBIANI G and EL NAHAS AM (1999):
Interferon- γ inhibits experimental renal fibrosis.
Kidney Int. 56: 2116-2127
- OLIVER J (1915):
The histogenesis of chronic uranium nephritis with especial reference to epithelial regeneration.
J. Exp. Med. 21: 425-451
- ONG ACM and FINE LG (1994):
Tubular-derived growth factors and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: Implications for human renal disease progression.
Am. J. Kidney Dis. 23: 205-209
- OSTENDORF T, KUNTER U, GRONE HJ, BAHLMANN F, KAWACHI H, SHIMIZU F, KOCH KM, JANJIC N and FLÖGE J (2001):
Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis.
J. Am. Soc. Nephrol. 12: 909-918
- OSTMAN A and HELDIN CH (2001):
Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists.
Adv. Cancer Res. 80: 1-38
- PALMERINI CA, FINI C, FLORIDI A, MORELLI H and VEDOVELLI A (1985):
High-performance liquid chromatographic analysis of free hydroxyproline and proline in blood plasma and of free and peptide-bound hydroxyproline in urine.
J. Chromatogr. 339: 285-292

- PAVLOVIC D, VLAHOVIC P, CVETKOVIC T, SAVIC V and KOCIC G (1998):
Is oxidative stress the biochemical basis of uranyl nitrate-induced acute renal failure?
Ren. Failure 20: 539-542
- PINES M and NAGLER A (1998):
Halofuginone: A novel antifibrotic therapy.
Gen. Pharmac. 30: 445-450
- PINES M, KNOPOV V, GENINA O, LAVELIN I and NAGLER A (1997):
Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents
dimethylnitrosamine-induced liver-cirrhosis.
J. Hepatol. 27: 391-398
- POLISSON RP, GILKESON GS, PYUN EH, PISETSKY DS, SMITH EA and SIMON LS (1996):
A multicenter trial of recombinant human interferon gamma in patients with systemic
sclerosis: effects on cutaneous fibrosis and interleukin 2 receptor levels.
J. Rheumatol. 23: 654-658
- RAMBALDI A and GLUUD C (2001):
Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis.
Liver 21: 129-136
- RIEDE UN und ROHRBACH R (1989):
Bindegewebspthologie. In: RIEDE UN, SCHAEFER HE, WEHNER H (Hrsg.):
Allgemeine und Spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart-New York (1989) S. 50-79
- RIEDEL E, NUNDEL M, ALGERMISSEN B, HAMPL H, SCIGALLA P and STABELL U (1989):
Changes in the concentrations of hydroxyproline, glycine and serine in the plasma of
haemodialysis patients undergoing erythropoetin therapy.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27: 851-856
- RITZ E und ANDRASSY K (1998):
Niere. In: SCHETTLER G, GRETEN H (Hrsg.): Innere Medizin, Thieme, Stuttgart-
New York (1998), S. 209-275
- ROSSMANN P, RÍHA I, MATOUŠOVIC K, BOHDANECKÁ M and BUKOVSKÝ A (1990):
Experimental ablation nephropathy.
Path. Res. Pract. 186: 491-506

- SANO K, FUJIGAKI Y, MIYAJI T, IKEGAYA N, OHISHI K, YONEMURA K and HISHIDA A (2000):
 Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate.
 Kidney Int. 57: 1560-1570
- SCHRAMM L und GALLE J (1998):
 Toxische Nephropathien. In: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K (Hrsg.): Innere Medizin, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998) S. 1290-1292
- SHANLEY PF (1996):
 The pathology of chronic renal ischemia.
 Sem. Nephrol. 16: 21-32
- SHARMA AK, MAUER SM, KIM Y and MICHAEL AF (1993):
 Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy.
 Kidney Int. 44: 774-788
- SHARPE CC, DOCKRELL MEC, SCOTT R, NOOR MI, COWSERT LM, MONIA BP and HENDRY BM (1999):
 Evidence of a role for ki-RAS in the stimulated proliferation of renal fibroblasts.
 J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1186-1192
- SILBERNAGL S und DESPOPOULOS A (1991):
 Niere, Salz- und Wasserhaushalt. In: SILBERNAGL S, DESPOPOULOS A (Hrsg.): Taschenatlas der Physiologie, Thieme, Stuttgart-New York (1991), S. 120-153
- SOMMER M und FÜNFSTÜCK R (1997):
 Zur Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose.
 Med. Klin. 92: 582-588
- SOMMER M, SCHALLER R, FÜNFSTÜCK R, BOHLE A, BÖHMER FD, MÜLLER GA and STEIN G (1999):
 Abnormal growth and clonal proliferation of fibroblasts in an animal model of unilateral ureteral obstruction.
 Nephron 82: 39-50
- SPENCER K (1986):
 Analytical reviews in clinical biochemistry: The estimation of creatinine.
 Ann. Clin. Biochem. 23: 1-25

- STECKLAIR KP, HAMBURGER DR, EGORIN MJ, PARISE RA, COVEY JM and EISEMAN JL (2001):
Pharmacokinetics and tissue distribution of halofuginone (NSC 713205) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats.
Cancer Chemother. Pharmacol. 48: 375-382
- STRATFORD MRL, WATFA RR, MURRAY C and MARTIN SG (1990):
Determination of collagen and protein turnover by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 529: 383-395
- STRUTZ F and MÜLLER GA (1996):
Congress Report: Göttingen, 7-9 July 1995: First Göttingen symposium on renal fibrosis: prevention and progression.
Nephrol. Dial. Transplant. 11: 737-739
- STRUTZ F and MÜLLER GA (1999):
Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage.
Kidney Blood Press. Res. 22: 71-80
- TAKADA S, TAKAHARA S, NISHIMURA K, ICHIMARU N, HONGSI J, KOKADO Y, KITAMURA M, MATSUMIYA K, MATSUMOTO K, NAKAMURA T and OKUYAMA A (1999):
Effect of hepatocyte growth factor on tacrolimus-induced nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats.
Transpl. Int. 12: 27-32
- TANAKA R, SUGIHARA K, TATEMATSU A and FOGO A (1995):
Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis – modulation of platelet-derived growth factor by angiotensin II.
Kidney Int. 47: 131-139
- THOMAS C und ULSHÖFER B (1996):
Harnwege. In: THOMAS C (Hrsg.): Spezielle Pathologie, Schattauer, Stuttgart-New York (1996) S. 367-378
- THOMAS GL, YANG B, WAGNER BE, SAVILL J and EL NAHAS AM (1998):
Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis.
Nephrol. Dial. Transplant. 13: 2216-2226

- THURMAN PA, HARDER S, WOLTER K, MUNCK AC and FRITSCHKA E (1997):
Pharmacokinetics of the PDGF-antagonist trapidil in patients with and without renal impairment.
Clin. Nephrol. 47: 99-105
- TOERNIG J, AMANN K, RITZ E, NICHOLS C, ZEIER M and MALL G (1996):
Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: The effects of Ramipiril, Nifedipine and Moxonidine.
J. Am. Sc. Nephrol. 7: 667-675
- VANHERWEGHEM JL, BARAMOWICZ D, TIELEMANS C and DEPIERREUX M (1996):
Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy.
Am. J. Kidney Dis. 27: 209-215
- VERCAUTEREN SR, YSEBAERT DK, DE GREEF KE, EYSKENS EJ and DE BROE ME (1999):
Chronic reduction in renal mass in the rat attenuates ischemia/reperfusion injury and does not impair tubular regeneration.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2551-2561
- WANNER und GALLE J (1998):
Chronische Niereninsuffizienz. In: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K (Hrsg.):
Innere Medizin, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998)
S. 1292-1300
- WEHNER H, RIEDE UN und FREUDENBERG N (1989):
Uropoetisches System. In: RIEDE UN, SCHAEFER HE, WEHNER H (Hrsg.):
Allgemeine und Spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart-New York (1989), S. 725-766
- YAMAMOTO T, NOBLE NA, MILLER DE and BORDER WA (1994):
Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis.
Kidney Int. 45: 916-927
- YANG J, DAI C and LIU Y (2001):
Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice.
Gene Ther. 8: 1470-1479

9 Anhang

9.1 Daten und Tabellen

Nachfolgend sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler (SF) aller gemessenen bzw. berechneten Ergebnisse in tabellarischer Form dargestellt. Anzahl der Tiere pro Gruppe: $n = 3-7$.

Abkürzungen:

Cl_{Krea}	Kreatininclearance
OH-Prolin	Hydroxyprolin (bezogen auf das Trockengewicht der Niere)
% H_2O	Wassergehalt der Niere
n.b.	nicht bestimmt

Es wurden weiterhin die Proteinkonzentration im Nierengewebe, Hydroxyprolin (OH-Prolin) und Prolin bezogen auf das Feuchtgewicht (FG) der Niere und auf die Proteinkonzentration im Nierengewebe, Prolin bezogen auf das Trockengewicht (TG) der Niere sowie die Quotienten aus $(Prolin/TG)/(OH-Prolin/TG)$ und $(Prolin/FG)/(OH-Prolin/FG)$ bestimmt bzw. berechnet. Jedoch ergaben sich hier im Verlauf der 20 Versuchswochen und im Vergleich unter den verschiedenen Versuchsgruppen keine relevanten Unterschiede, so daß wir auf die Darstellung dieser Werte verzichteten.

Versuche: temporäre warme Ischämie

Tabelle 1: Verlauf der verschiedenen untersuchten Parameter (Abkürzungen siehe S. 107) während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen. Ko Isch = Kontrolltiere der Ischämie-Gruppe (Schein-Operation, uNX). Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 4-7; **x** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 12. Woche; **o** = signifikante Unterschiede zur 16. Woche.

Ko Isch	8.Woche SF	12.Woche SF	16.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	229 3	249 6 x	259 4 x	256 4 x
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,47 0,04	0,52 0,06	0,48 0,04	0,22 0,02 xvo
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,12 0,03	0,09 0,03	0,32 0,06 xv	0,17 0,09 o
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,45 0,06	0,34 0,02	0,32 0,02	0,38 0,04
OH-Prolin [μmol/g TG]	27 2	24 1 v	32 2 v	33 2 v
% H ₂ O	75 1	77 2 x	80 1 x	80 1 x

Tabelle 2: Darstellung der verschiedenen untersuchten Parameter (Abkürzungen siehe S. 107) über den Versuchszeitraum von 20 Wochen. Isch 20 = warme Ischämie für 20 Minuten Dauer. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-4; **x** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 12. Woche.

Isch 20	8.Woche SF	12.Woche SF	16.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	233 6	230 7	252 16	255 5 xv
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,48 0,05	0,64 0,07	0,47 0,35	0,36 0,10
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,24 0,10	0,79 0,57	0,18 0,10	0,28 0,12
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,30 0,01	0,30 0,03	0,34 0,12	0,44 0,03 xv
OH-Prolin [μmol/g TG]	22 x	30 2 x	36 6 x	38 5 x
% H ₂ O	n.b.	79 1	80 2	82 2

Tabelle 3: Gemessene Parameter der Versuchsgruppe Isch 45 (= warme Ischämie für 45 Minuten) für den Versuchszeitraum von 20 Wochen. Abkürzungen siehe S. 107. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-4; x = signifikante Unterschiede zur 8. Woche.

Isch 45	8.Woche SF	12.Woche SF	16.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	221 9 x	264 2 x	250 9 x	253 10
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,18 0,04	0,25 0,05 x	0,41 0,05	0,28 0,09
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,13 0,07	0,09 0,01	0,21 0,08	0,38 0,12
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,34 0,05	0,24 0,04	0,36 0,08	0,35 0,04
OH-Prolin [μmol/g TG]	26 2	26 2	28 7	37 6
% H ₂ O	78 0	76 1	78 2	80 2

Versuche: 5/6 NX

Tabelle 4: Verlauf der während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen untersuchten Parameter für Ko NX = Kontrolltiere der Gruppe 5/6 Nephrektomie (Scheinoperation). Abkürzungen siehe S. 107. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-6; **x** = signifikante Unterschiede zur 1. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **o** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **~** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

Ko NX	1.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	167 6	222 7	231 5	254 7	284 12
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,58 0,06	0,69 0,09	0,36 0,05	0,32 0,09	0,27 0,13
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,08 0,02	0,10 0,01	0,06 0,01	0,09 0,02	0,09 0,03
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,83 0,07	n.b.	0,56 0,09	0,38 0,04	0,55 0,06
OH-Prolin [μmol/g TG]	19 1	24 2	25 2	25 5	28 1
% H ₂ O	77 1	77 2	77 1	80 1	77 1

Tabelle 5: Darstellung der untersuchten Parameter der Gruppe 5/6 NX (= 5/6 Nephrektomie) für den Versuchszeitraum von 20 Wochen. Abkürzungen siehe S. 107. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 6; **x** = signifikante Unterschiede zur 1. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **o** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **~** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

5/6 NX	1.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	154 5	207 6	217 3	225 6	255 5
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,46 0,07	0,79 0,12	0,36 0,10	0,43 0,08	0,40 0,07
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,15 0,02	0,49 0,11	0,09 0,02	1,83 0,21	2,86 0,51
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,34 0,02	n.b.	0,24 0,02	0,37 0,04	0,37 0,03
OH-Prolin [μmol/g TG]	33 6	25 2	28 1	35 2	50 3
% H ₂ O	79 1	78 1	80 1	79 1	82 0

Versuche: Uranylinitrat

Tabelle 6: Verlauf der untersuchten Parameter für die UN-Kontrollgruppe (Ko UN = 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p.) (Abkürzungen siehe S. 107) während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 4-6; **x** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **o** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **~** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

Ko UN	2. Woche SF	4. Woche SF	8. Woche SF	10. Woche SF	20. Woche SF
Körpergewicht [g]	206 9	219 6	246 11	252 5	252 4
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,61 0,13	0,72 0,04	0,41 0,06	0,19 0,07	0,24 0,04
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,08 0,01	0,10 0,01	0,07 0,01	0,05 0,01	0,10 0,01
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,67 0,08	0,67 0,05	0,58 0,04	0,60 0,04	0,57 0,03
OH-Prolin [μmol/g TG]	25 3	22 1	39 3	31 3	44 2
% H ₂ O	82 1	75 1	78 1	78 2	78 1

Tabelle 7: Parameter der Versuchsgruppe UN 0,3 (= 0,3mg Uranylrat/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG i.p.). Abkürzungen siehe S. 107. Bestimmung der Werte über den Versuchszeitraum von 20 Wochen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-4; **x** = signifikanter Unterschied zum vorherigen Versuchstermin.

UN 0,3	1. Tag SF	2. Tag SF	3. Tag SF	4. Tag SF	5. Tag SF	6. Tag SF	7. Tag SF	8. Tag SF	9. Tag SF	10. Tag SF	11. Tag SF	12. Tag SF
Körpergewicht [g]	169 6	169 5	171 5	173 7	162 5	156 4	161 4	163 4	174 4	179 4	181 4	184 4
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,57 0,12	0,73 0,11	0,44 0,12	0,59 0,07	0,98 0,15	1,02 0,14	0,76 0,19	0,34 0,05	0,40 0,07	0,47 0,05	0,56 0,07	0,31 0,05
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,49 0,15	1,64 0,22	0,88 0,23	1,94 0,45	1,93 0,38	1,79 0,41	0,62 0,12	0,32 0,05	0,24 0,04	0,21 0,03	0,23 0,04	0,08 0,01

UN 0,3	2. Wo. SF	4. Wo. SF	8. Wo. SF	10. Wo. SF	11. Wo. SF	12. Wo. SF	13. Wo. SF	14. Wo. SF	15. Wo. SF	16. Wo. SF	17. Wo. SF	18. Wo. SF	19. Wo. SF	20. Wo. SF
Körpergewicht [g]	189 1	210 6	243 13	245 5	247 11	250 10	248 7	259 8	256 13	255 12	255 12	264 10	260 12	271 11
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,46 0,10	0,67 0,06	0,48 0,08	0,26 0,03	0,21 0,09	0,18 0,05	0,08 0,02	0,23 0,06	0,12 0,06	0,08 0,03	0,08 0,03	0,12 0,05	0,09 0,04	0,16 0,01
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,10 0,01	0,06 0,02	0,12 0,03	0,08 0,02	0,06 0,02	0,10 0,01	0,03 0,01	0,07 0,01	0,05 0,04	0,05 0,01	0,06 0,02	0,08 0,02	0,06 0,02	0,10 0,01
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,37 0,05	0,53 0,11	0,56 0,05	0,51 0,03	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,54 0,04
OH-Prolin [μmol/g TG]	37 2	37 4	21 8	47 2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	50 4
% H ₂ O	78 1	79 1	79 1	78 1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	79 2

Tabelle 8: Auflistung der über den Versuchszeitraum von 20 Wochen untersuchten Parameter (Abkürzungen siehe S. 107). UN 0,5 = 0,5mg Uranylнитрат/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG i.p.. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-6; **x** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **v** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **o** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **~** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

UN 0,5	2. Woche SF	4. Woche SF	8. Woche SF	10. Woche SF	20. Woche SF
Körpergewicht [g]	191 8 x	216 5 xv	227 2 xv	236 8 xv	255 7 xvo
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,57 0,09	0,70 0,08 xv	0,16 0,02 xv	0,22 0,04 xv	0,08 0,01 xv~
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,08 0,01 x	0,15 0,01 x	0,13 0,01 x	0,11 0,02	0,37 0,08 x~
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	0,53 0,02	0,67 0,08	0,50 0,06	0,45 0,04 v	0,32 0,04 xvo
OH-Prolin [μmol/g TG]	27 2 x	47 6 x	61 5 xv	66 6 xv	43 7 xo~
% H ₂ O	80 1	81 1	81 1	81 0	78 1 vo~

Versuche: Ag 1295

Tabelle 9: Parameter der Gruppe Ko Ag 1295 = täglich 1,2mg Ag 1295/100g KG in 0,5ml 1%-iger Tylose/100g KG i.p. über 2 Wochen, am 2. Tag einmalige Gabe von 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p.. Abkürzungen siehe S. 107. Bestimmung der Werte über 4 Wochen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 5-6; **x** = signifikante Unterschiede zum 2. Tag; **v** = signifikante Unterschiede zum 7. Tag; **o** = signifikante Unterschiede zum 10. Tag; **~** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche.

Ko Ag 1295	2.Tag SF	7.Tag SF	10.Tag SF	2.Woche SF	4.Woche SF
Körpergewicht [g]	143 3	155 5	155 5	177 2 xvo	195 5 xvo~
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,44 0,11	0,38 0,09	0,21 0,06	0,16 0,02 x	0,44 0,09
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,07 0,01	0,11 0,02	0,08 0,01	0,06 0,01 v	0,08 0,02
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	n.b.	n.b.	n.b.	0,35 0,03	0,56 0,10
OH-Prolin [μmol/g TG]	n.b.	n.b.	n.b.	55 4 ~	36 1
% H ₂ O	n.b.	n.b.	n.b.	80 1	78 1

Tabelle 10: Verlauf der untersuchten Parameter für die Gruppe UN 0,5 + Ag 1295 (= täglich 1,2mg Ag 1295/100g KG in 0,5ml 1%-iger Tylose/100g KG i.p. über 2 Wochen, am 2. Tag einmalige Gabe von 0,5mg Uranylrat/100g KG in 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p.). Abkürzungen siehe S. 107. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-6; **x** = signifikante Unterschiede zum 2. Tag; **v** = signifikante Unterschiede zum 7. Tag; **o** = signifikante Unterschiede zum 10. Tag; **~** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **+** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **s** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **?** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

UN 0,5 + Ag 1295	2.Tag SF	7.Tag SF	10.Tag SF	2.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	151 4	142 4	151 4	178 4 xvo	187 5 xvo	218 6 xvo~+	207 5 xvo~+	257 9 xvo~+s?
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,51 0,06	0,76 0,11	0,74 0,11	0,79 0,15 xvo	0,33 0,04 xvo~	0,40 0,11 v	0,09 0,03 xvo~+	0,51 0,08 ?
Proteinurie [mg/100g KG x h]	1,50 0,22	1,53 0,13	0,45 0,08 xv	0,17 0,03 xvo	0,22 0,05 xvo	0,25 0,07 xv	0,18 0,02 xvo	0,60 0,06 xv~+s?
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,49 0,09	0,41 0,07	0,26 0,05	0,49 0,06 ?
OH-Prolin [μmol/g TG]	n.b.	n.b.	n.b.	64 7	49 11	102 15 ~+	73 9 +	43 1 ~s?
% H ₂ O	n.b.	n.b.	n.b.	87 1	83 1 ~	79 1 ~+	80 1 ~	78 0 ~+

Versuche: Halofuginone

Tabelle 11: Darstellung der verschiedenen untersuchten Parameter während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen. Abkürzungen siehe S. 107. Ko Halo = täglich 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p. über 20 Wochen, am 2. Tag einmalige Gabe von 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p.. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-7; **x** = signifikante Unterschiede zum 2. Tag; **v** = signifikante Unterschiede zum 7. Tag; **o** = signifikante Unterschiede zum 10. Tag; **~** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **+** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **s** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **?** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

Ko Halo	2.Tag SF	7.Tag SF	10.Tag SF	2.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	146 5	155 4	155 4	185 2 xvo	212 5 xvo~	239 6 xvo~+	220 3 xvo~s	283 4 xvo~+s?
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,24 0,09	0,23 0,14	0,22 0,05	0,27 0,08	0,38 0,05 o	0,40 0,08	0,48 0,17	0,26 0,10
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,07 0,01	0,06 0,02	0,08 0,01	0,06 0,01	0,08 0,01	0,09 0,01	0,04 0,01 o~+	0,06 0,01 +
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	n.b.	n.b.	n.b.	0,47 0,07	0,41 0,04	0,54 0,05	0,62 0,16	0,49 0,05
OH-Prolin [µmol/g TG]	n.b.	n.b.	n.b.	45 1	29 4 ~	38 3 ~	51 3 +s	33 2 ~?
% H ₂ O	n.b.	n.b.	n.b.	81 1	78 1 ~+	75 1 ~+	77 0 ~	75 1 ~?

Tabelle 12: Parameter der Versuchsgruppe UN 0,5 + Halo I (= täglich 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p. über 20 Wochen, am 2. Tag einmalige Gabe von 0,5mg Uranyl nitrat/100g KG in 5ml 0,9%-ige NaCl-Lösung/100g KG i.p.). Abkürzungen siehe S. 107. Bestimmung der Werte über den Versuchszeitraum von 20 Wochen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SF); n = 3-7; **x** = signifikante Unterschiede zum 2. Tag; **v** = signifikante Unterschiede zum 7. Tag; **o** = signifikante Unterschiede zum 10. Tag; **~** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **+** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **s** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **?** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

UN 0,5 + Halo I	2.Tag SF	7.Tag SF	10.Tag SF	2.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	150 3 x	136 3	151 7	174 5 xvo	199 3 xvo~	226 7 xvo~+	230 3 xvo~+	261 4 xvo~+s?
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,47 0,15	0,76 0,11	0,62 0,07	0,40 0,11 v	0,41 0,07 v	0,30 0,12	0,44 0,10	0,63 0,11
Proteinurie [mg/100g KG x h]	1,40 0,51	1,18 0,16 v	0,32 0,07	0,13 0,01 vo	0,13 0,03 vo	0,10 0,02 vo	0,24 0,03 v~+s	0,15 0,03 v
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,44 0,03	0,40 0,04	0,58 0,08	0,63 0,05 s
OH-Prolin [µmol/g TG]	n.b.	n.b.	n.b.	58 5	55 2	52 4	65 7 ~+?	33 3
% H ₂ O	n.b.	n.b.	n.b.	83 1	82 1 ~+	78 0 ~+	80 1 ~	77 1 ~+?

Tabelle 13: Verlauf der verschiedenen untersuchten Parameter (Abkürzungen siehe S. 107) während des Versuchszeitraumes von 20 Wochen. UN 0,5 + Halo II = einmalige Gabe von 0,5mg Uranyl nitrat/100g KG in 5ml 0,9%-iger NaCl-Lösung/100g KG i.p., ab dem 10. Tag nach UN-Applikation 4µg Halofuginone/100g KG in 0,5ml 2%-igem Ethanol/100g KG i.p. über 20 Wochen. Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (SF); n = 3-7; **x** = signifikante Unterschiede zum 2. Tag; **v** = signifikante Unterschiede zum 7. Tag; **o** = signifikante Unterschiede zum 10. Tag; **~** = signifikante Unterschiede zur 2. Woche; **+** = signifikante Unterschiede zur 4. Woche; **s** = signifikante Unterschiede zur 8. Woche; **?** = signifikante Unterschiede zur 10. Woche.

UN0,5 + Halo II	2.Tag SF	7.Tag SF	10.Tag SF	2.Woche SF	4.Woche SF	8.Woche SF	10.Woche SF	20.Woche SF
Körpergewicht [g]	146 4	145 4 x	156 3	171 3 xvo	199 5 xvo~	224 4 xvo~+	226 4 xvo~+	265 4 xvo~+s?
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,23 0,05	0,71 0,19 x	0,44 0,12	0,34 0,08	0,45 0,08 x	0,42 0,11	0,34 0,06	0,44 0,14
Proteinurie [mg/100g KG x h]	0,59 0,19	0,49 0,13	0,22 0,05	0,06 0,01 xvo	0,10 0,01 v~	0,12 0,01 v~	0,10 0,01 v~	0,08 0,01 xvos
Cl _{Krea} [ml/100g KG x min]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,67 0,09	0,55 0,04	0,57 0,09	0,64 0,05
OH-Prolin [µmol/g TG]	n.b.	n.b.	n.b.	57 8	55 3	49 4 ~+	43 3 ~+	27 4 ~+s?
% H ₂ O	n.b.	n.b.	n.b.	81 1	82 1 ~+	76 1 s	79 1 s	75 1 ~+?

9.2 Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Fleck für die fachliche Anleitung bei der Durchführung der Versuche sowie für die intensive Betreuung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. D. Appenroth danken wir für die wertvolle Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen und die Hilfestellung im Labor.

Herrn Prof. Dr. G. Stein, Direktor der Klinik für Innere Medizin IV der FSU Jena, danken wir für die Themenwahl und die freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Versuche.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Kriegsmann (Mainz) und Herrn Prof. Dr. M. Danz bedanken wir uns für die Hilfe bei den morphologischen Untersuchungen.

Des Weiteren danken wir Frau Dr. A. Lupp, Herrn Dr. M. Schwertfeger, Herrn Dr. M. Sommer und den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Innere Medizin der FSU Jena sowie Frau A. Berthold für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

9.3 Lebensläufe

9.3.1 Angaben zur Person (Sabine Sawall)

Name:	Sawall, Sabine
Geburtsdatum:	18.11.1975
Geburtsort:	Heilbronn

Ausbildung

1982-1986	Grundschule Schwaigern (Baden-Württemberg)
1986-1995	Gymnasium Eppingen (Baden-Württemberg)
22.06.1995	Abitur
10/1995-11/2001	Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2001	Hochschulabschluß in der Fachrichtung Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem 3. Staatsexamen
ab 02/2002	Ärztin im Praktikum am Klinikum Villingen-Schwenningen, Abteilung Gynäkologie/Geburtshilfe

Ort, Datum	Unterschrift
------------	--------------

9.3.2 Angaben zur Person (Jutta Splinther)

Name: Splinther, Jutta

Geburtsdatum: 19.12.1975

Geburtsort: Heilbronn

Ausbildung

1982-1986 Grundschule Weinsberg (Baden-Württemberg)

1986-1995 Justinus Kerner Gymnasium Weinsberg

27.06.1995 Abitur

10/1995-12/2001 Studium der Medizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

12/2001 Hochschulabschluß in der Fachrichtung Medizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem 3. Staatsexamen

ab 03/2002 Ärztin im Praktikum an der Helios Klinik Blankenhain,
Internistische Abteilung

Ort, Datum

Unterschrift

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung und Selbständigkeitserklärung

Hiermit erklären wir, daß uns die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

wir die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von uns benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind,

uns folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. Ch. Fleck, Frau Dr. D. Appenroth, Herr Prof. Dr. G. Stein, Herr Dr. M. Sommer und die Mitarbeiter des Labors der Klinik für Innere Medizin, Herr Prof. Dr. M. Danz, Herr Prof. Dr. J. Kriegsmann (Mainz), Herr Dr. M. Schwertfeger, Frau Dr. A. Lupp und Frau A. Berthold,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von uns für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß wir die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben und

daß wir die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht haben.

Die einzelnen Kapitel wurden wie folgt bearbeitet:

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Zusammenfassung:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Einleitung:	Sabine Sawall
Ziele der Arbeit:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Material und Methode:	Jutta Splinther
Ergebnisse 5.1 bis 5.3:	Sabine Sawall
Ergebnisse 5.4 bis 5.6:	Jutta Splinther
Diskussion 6.1:	Sabine Sawall

Diskussion 6.2:	Jutta Splinther
Schlußfolgerung:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Literaturverzeichnis:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Anhang:	Sabine Sawall und Jutta Splinther
Thesen:	Sabine Sawall und Jutta Splinther

Ort, Datum	Sabine Sawall	Jutta Splinther
------------	---------------	-----------------